

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CONSUELO REIS PEREIRA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROSCÓPICO COM
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANLODIPINO E
LOSARTANO EM ASSOCIAÇÃO

CURITIBA
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CONSUELO REIS PEREIRA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROSCÓPICO COM
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANLODIPINO E
LOSARTANO EM ASSOCIAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Angela Cristina Leal Badaró
Trindade

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA
2011

Pereira, Consuelo Reis

Desenvolvimento e validação de método espectroscópico com calibração multivariada para quantificação de anlodipino e losartano em associação / Consuelo Reis Pereira - Curitiba, 2011.

145 f.: il. (algumas color.); 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Angela Cristina Leal Badaró Trindade

Coorientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Medicamentos. 2. Controle de qualidade. 3. Calibração multivariada. 4. Losartano potássico. 5. Besilato de anlodipino. 6. Espectroscopia UV-VIS. I. Trindade, Angela Cristina Leal Badaró. II. Pontarolo, Roberto. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

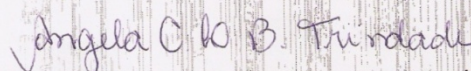
CDD 615.1

TERMO DE APROVAÇÃO

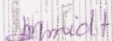
CONSUELO REIS PEREIRA

Título: "DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROSCÓPICO COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANLODIPINO E LOSARTANO EM ASSOCIAÇÃO"

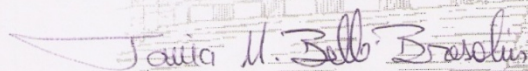
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.



Profª. Drª. Angela Cristina Leal Badaró Trindade
Orientadora



Profª. Drª. Iara Messerschmidt
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Tania Mari Bellé Bresolin
Universidade do Vale do Itajaí

Curitiba, 11 de julho de 2011.

A meu avô, professor Renê Reis, que mesmo ausente, sempre foi um exemplo a ser seguido. Inculuiu em nós o gosto pelo estudo, a importância do esforço, do respeito pelos outros e da necessidade de ter fé.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por me dar força e fé para chegar até aqui.

A minha mãe, Isabel, exemplo vivo de determinação e esforço. Sem você não seria a pessoa que sou hoje.

A minha irmã, Carina, pelo apoio, incentivo, brigas e festas. E às “irmãs” Alessandra e Clau, pelo amor e carinho, pelas muitas e muitas horas de artesanato, festas, shows inesquecíveis e também pelos ombros emprestados...

A meu pai, J. Nabôr, que sempre me incentivou em meu sonho de ser farmacêutica.

À minha orientadora, professora Dr^a Angela Trindade, por toda paciência, correções e por ter conseguido me fazer uma profissional e uma pessoa melhor.

Ao meu coorientador, professor Dr Roberto Pontarolo, a quem aprendi a compreender e respeitar, nesses anos de convivência mais próxima.

Aos amigos de tantos anos, Pricila, Flávia, Dante, Emmanuelle, Andressa, Geandra, Vanessa, Patrícia, Karla, Márcia, Denise e Keiko. Pelos inúmeros momentos importantes onde vocês estiveram presentes na minha vida.

Aos amigos de faculdade, Tays, Ricardo e Gustavo, por conseguirmos nos apoiar, incondicionalmente.

À amiga Aline Davet, pelas várias manhãs passadas na feirinha do Largo e pelo plano B que até agora não pudemos colocar em prática.

Ao meu amigo e chefe Luiz Machado, por me ensinar que a boa liderança pode mover montanhas e tornar equipes e pessoas vitoriosas.

Aos colegas de trabalho das empresas por onde passei, por todas as dificuldades vencidas, risadas, trabalho duro e aprendizado.

Às amigas Eides Medeiros e Heloísa Helena, que conseguiram muitas e muitas vezes, minimizar as minhas tensões psicológicas e físicas.

Às colegas de mestrado, que ingressaram comigo e sempre me deram força, nos momentos mais complicados, de uma forma especial Giovanna Strapasson, Paty Pavan, Camila Mercalli, Bianca Hess e Marcela Tiboni. Agradeço imensamente todo o carinho dos momentos em que estivemos juntas ou distantes, torcendo sempre umas pelas outras!!

Aos colegas de trabalho diário, por toda ajuda com as análises, almoços no RU, risadas nos intervalos, festas e por aguentarem todos os desabafos: Marco Cardoso, João Gasparetto, Flávia Degaut, Sirley Hayashi, Cleverson Martins, Letícia Bonancio, Caroline Uber, Francinete Campos, Thaís Francisco e Mário Piantavini.

Aos colegas de sala, que também contribuíram em momentos de descontração ou mesmo nos mais tensos: Cassyano Correr, Graziela Sponchiado, Andréia Sanches, Ana Melchior, Luana Lenzi, Astrid Wiens e Rafael Venson.

Aos professores que me auxiliaram em tantos momentos desde minha graduação, sempre incentivando minha caminhada: Wanda Abrahão, Gracce Wille, Maria Eugênia Tristão, Tânia Bonfim, Grace Bareta, Sandra Zanin, Sandra Barreira, Carlos Garcia e Fábio Murakami. Também aos professores Alan Gonçalves e Dile Stremel, pelas colaborações de correções.

Ao programa de pós-graduação em Química desta Universidade, em especial ao professor Dr Patrício Peralta-Zamora e à professora Dr^a Noemi Nagata, pela orientação e auxílio com o uso da calibração multivariada. E ao professor Dr Herbert Winnischofer e à técnica Grazielli da Rocha, pelo auxílio no uso do equipamento de Infravermelho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao programa REUNI.

E às professoras da minha banca, professora Dr^a Tania Mari Bellé Bresolin e professora Dr^a Iara Messerschmidt, pelo tempo e sugestões despendidas para tornarem esse trabalho melhor.

Aprendamos a sonhar, senhores, pois então talvez nos apercebamos da verdade.

Augusto Kekulé

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de desenvolver e validar uma metodologia para a quantificação simultânea dos fármacos anlodipino e losartano em associação farmacêutica comercial. Para tal, utilizou-se a metodologia de espectroscopia na região do ultravioleta, com uso de calibração multivariada. Como o medicamento comercial foi utilizado para a montagem de modelos multivariados, inicialmente foi necessária a quantificação por método validado (CLAE). Modelos multivariados foram desenvolvidos para duas apresentações comerciais: 2,5 + 50 mg e 5 + 50 mg de anlodipino e losartano potássico, respectivamente. Um conjunto de 25 soluções foi preparado e submetido à análise em espectrofotômetro na região do ultravioleta por varredura entre 200 e 400 nm. Os dados de absorvância obtidos foram submetidos a rotinas no software MATLAB, para análise de componentes principais e, posteriormente, para regressão de mínimos quadrados parciais. Quando foi realizada a quantificação simultânea por PLS2 os resultados não foram satisfatórios e o método não pôde ser validado. Com os mesmos dados espectrais obtidos para o modelo multivariado PLS2, foram então desenvolvidos modelos separados de calibração multivariada para a quantificação de cada fármaco por PLS1. Nestes modelos foram utilizados os dados espectrais na faixa de 230 a 310 nm de absorvância para o losartano potássico e de 320 a 400 nm para o besilato de anlodipino. Em ambos os modelos, o pré-processamento de dados foi o centrado na média. Os modelos desenvolvidos para a quantificação dos fármacos na apresentação comercial contendo 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico foram desenvolvidos com quatro variáveis latentes e se mostraram adequados frente à validação externa. No entanto, não foram obtidos resultados satisfatórios na validação utilizando amostras externas. Para a apresentação comercial contendo 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, nos modelos desenvolvidos foram utilizadas duas variáveis latentes e estes modelos puderam ser validados, obtendo valores de quantificação para repetitividade de 101,73% para losartano potássico e 100,06% de besilato de anlodipino, para precisão intermediária de 102,13% para losartano potássico e de 100,08% para besilato de anlodipino, com valores de coeficiente de variação abaixo de 5% e variações menores do que 2% para exatidão. A robustez foi avaliada frente a alterações de pH, temperatura e estabilidade, sendo verificada a necessidade de cuidado frente a diminuição do pH, mas robusto frente aos demais parâmetros avaliados. Para a estabilidade, ficou recomendada a realização da leitura logo após o preparo das soluções, com limite de no máximo 10 horas.

Palavras-chave: Medicamentos. Controle de qualidade. Calibração multivariada. Losartano potássico. Besilato de anlodipino. Espectroscopia UV-VIS.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and to validate a methodology for simultaneous quantification of the drugs amlodipine and losartan potassium in a commercial fixed-dose combination. For this purpose, UV spectroscopy with multivariate calibration was utilized. A commercial presentation was used to develop multivariate models, initially, the drugs were quantified by validated method (HPLC). Multivariate models were developed for two presentations of the drug trade: 2.5 + 50 mg and 5 + 50 mg of amlodipine and losartan potassium, respectively. A set of 25 solutions was prepared and submitted to spectrophotometer analysis by ultraviolet scanning between 200 and 400 nm. The absorbance data were subjected to the routines in MATLAB software for analysis of main components and then to partial least squares regression. The results were not satisfactory using simultaneous quantification by PLS2 and the method could not be validated. With the same spectral data obtained for the multivariate model PLS2, separate multivariate calibration models were developed for the quantification of each drug using PLS1. In these models were used the absorbance spectral data in the range 230 to 310 nm for the losartan potassium and 320 to 400 nm for amlodipine besylate. In both models, the pre-processing of data was the mean-centered. The models for the quantification of drugs in commercial tablets containing 2.5 mg of amlodipine + 50 mg of losartan potassium were developed with four latent variables and were adequate in external validation. However, no satisfactory results were obtained in validation when external samples were used. For commercial presentation containing 5 mg of amlodipine + 50 mg of losartan potassium, two latent variables were used to develop models and these models could be validated, obtaining quantification values for repeatability of 101.73% for losartan potassium and 100.06% for amlodipine besylate, for intermediate precision of 102.13% for losartan potassium and 100.08% for amlodipine besylate, with values of coefficient of variation below 5% and variations smaller than 2% for accuracy. The robustness was evaluated from pH and temperature variations and stability, and was verified the need for caution when decreasing pH, but robust compared to other parameters. For stability, it was recommended to use the sample solution immediately after preparation, with the stability limit of up to 10 hours.

Keywords: Drugs. Quality control. Multivariate calibration. Losartan potassium. Amlodipine besylate. UV-VIS Spectroscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Fórmula estrutural do losartano potássico (THE UNITED States Pharmacopeia, 2006).	32
FIGURA 2 - Fórmula estrutural do besilato de anlodipino (BRITISH Pharmacopoeia 2007, 2007).	34
FIGURA 3 - Regiões do espectro eletromagnético com suas respectivas alterações (SKOOG et al., 2000).	36
FIGURA 4 - Resumo dos níveis energéticos eletrônicos na região do ultravioleta próximo. As transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ estão representadas (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1997).	38
FIGURA 5 - Fórmulas estruturais do (a) losartano potássico e (b) besilato de anlodipino, destacando os grupos cromóforos, em vermelho (THE UNITED States Pharmacopeia, 2006; BRITISH Pharmacopoeia 2007, 2007).	39
FIGURA 6 - Representação esquemática do processo de calibração (FERREIRA et al., 1999).	42
FIGURA 7 - (a) Matriz de variáveis independentes, gerada por dados espectrofotométricos e (b) matriz de variáveis dependentes (FERREIRA et al., 1999).	42
FIGURA 8 - Gráfico de um conjunto de dados bidimensionais, λ_1 e λ_2 , demonstrando os eixos das variáveis latentes, PC1 e PC2 (FERREIRA et al., 1999).	45
FIGURA 9 - Representação geométrica da propriedade de ortogonalidade do Sinal Analítico Líquido - NAS (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).	52
FIGURA 10 - Conjunto de amostras utilizadas na montagem dos modelos multivariados, apresentando a variação das concentrações dos fármacos para a apresentação 2,5 + 50 mg, a partir da concentração nominal utilizada ($C_1 = 40 \mu\text{g/mL}$ de losartano potássico e $2,778 \mu\text{g/mL}$ de besilato de anlodipino).	77

FIGURA 11 - Conjunto de amostras utilizadas na montagem dos modelos multivariados, apresentando a variação das concentrações dos fármacos para a apresentação 5 + 50 mg, a partir da concentração nominal utilizada ($F1= 40 \mu\text{g/mL}$ de losartano potássico e $5,556 \mu\text{g/mL}$ de besilato de anlodipino).	78
FIGURA 12 - Cromatograma dos fármacos presentes no medicamento comercial, apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (Condições cromatográficas: Coluna C18, 150 x 4,6 mm, 5 μm , fase móvel acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0, eluição gradiente).....	91
FIGURA 13 - Cromatograma dos fármacos presentes no medicamento comercial, apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (Condições cromatográficas: Coluna C18, 150 x 4,6 mm, 5 μm , fase móvel acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0, eluição gradiente).....	91
FIGURA 14 - Espectros na região do infravermelho dos fármacos, comparando padrão de besilato de anlodipino e mistura dos padrões dos fármacos, nas mesmas concentrações, em brometo de potássio (BA: padrão de besilato de anlodipino; BA + LP: mistura de padrões de besilato de anlodipino e losartano potássico).....	92
FIGURA 15 - Espectros na região do infravermelho dos fármacos, comparando padrão de losartano potássico e mistura dos padrões dos fármacos, nas mesmas concentrações, em brometo de potássio (LP: padrão de losartano potássico; BA + LP: mistura de padrões de besilato de anlodipino e losartano potássico).....	93
FIGURA 16 - Espectros na região do infravermelho dos fármacos, comparando mistura dos padrões e medicamento comercial, na apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, nas mesmas concentrações, em brometo de potássio.....	93

FIGURA 17 - Espectros na região do ultravioleta da <i>solução amostra C1</i> e da mistura das <i>soluções padrão LP-B</i> e <i>BA-B</i> , demonstrando a diferença espectral obtida com diferentes tempos e tipos de agitação: a) 30 minutos de agitação em banho de ultrassom; b) 30 minutos de agitação mecânica mais trinta minutos de agitação em banho de ultrassom.....	95
FIGURA 18 - Espectros na região do ultravioleta das <i>soluções amostra C1</i> (concentração 40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino), utilizando diferentes diluentes: (a) Espectro da solução de leitura, empregando acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 (solução controle); (b) Espectros sobrepostos das soluções controle e diluída com metanol; (c) Espectros sobrepostos das soluções controle e diluída com mistura etanol:água 50:50 (v/v); (d) Espectros sobrepostos das amostras controle e diluída com água. ..	100
FIGURA 19 - Perfil espectroscópico dos fármacos, (a) na <i>solução padrão BA-B</i> diluída (concentração: 2,776 µg/mL de besilato de anlodipino); (b) na <i>solução padrão LP-C</i> diluída (concentração: 40 µg/mL de losartano potássico); (c) numa mistura das <i>soluções padrão LP-C</i> e <i>BA-B</i> diluídas (concentração: 2,776 µg/mL de besilato de anlodipino e 40 µg/mL de losartano potássico); e (d) na <i>solução amostra C1</i> (40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino). ..	101
FIGURA 20 - Perfil espectroscópico dos fármacos em solução, apresentando sobreposição espectral na região entre 200 e 300 nm, aproximadamente. (Concentração dos fármacos: <i>LP</i> = 40 µg/mL de losartano potássico e <i>BA</i> = 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino)..	102
FIGURA 21 - Espectros na região do ultravioleta das <i>soluções amostra C1</i> a <i>C25</i> do conjunto de calibração para quantificação dos fármacos no medicamento comercial, apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (Concentração nominal dos fármacos: 40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino).....	104

FIGURA 22 - Espectros na região do ultravioleta das <i>soluções amostra F1 a F25</i> do conjunto de calibração para quantificação dos fármacos no medicamento comercial, apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (Concentração nominal dos fármacos: 40 µg/mL de losartano potássico e 5,556 µg/mL de besilato de anlodipino).....	105
FIGURA 23 - Definição do conjunto de validação externa através da rotina de PCA (amostras circuladas em vermelho) para o medicamento comercial, na apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.	106
FIGURA 24 - Definição do conjunto de validação externa através da rotina de PCA (amostras circuladas em vermelho) para o medicamento comercial, na apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.	107
FIGURA 25 - Gráfico de resíduo de Student X <i>leverage</i> para modelo multivariado do tipo PLS2, para os fármacos na apresentação comercial contendo 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (LP: losartano potássico (A); BA: besilato de anlodipino (B)).	112
FIGURA 26 - Definição do conjunto de validação externa através da rotina de PCA, para a amostra do medicamento comercial, na apresentação 2,5 + 50 mg, para quantificação por PLS1 do losartano potássico e do besilato de anlodipino.....	114
FIGURA 27 - Gráfico de resíduo de Student X <i>leverage</i> para modelos multivariados do tipo PLS1, para os fármacos na apresentação contendo 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (LP: losartano potássico (A); BA: besilato de anlodipino (B)).	117
FIGURA 28 - Gráfico de resíduo de Student X <i>leverage</i> para modelo multivariado do tipo PLS2, para os fármacos na apresentação contendo 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (LP: losartano potássico (A); BA: besilato de anlodipino (B)).	120
FIGURA 29 - Definição do conjunto de validação externa através da rotina de PCA, para a amostra do medicamento comercial, na apresentação 5 + 50 mg, para quantificação por PLS1 do losartano potássico e do besilato de anlodipino.....	122

FIGURA 30 - Gráfico de resíduo de Student X <i>leverage</i> para modelos multivariados do tipo PLS1, para os fármacos na apresentação contendo 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (LP: losartano potássico (A); BA: besilato de anlodipino (B)).	124
FIGURA 31 - Espectros na região do ultravioleta das <i>soluções de validação D</i> do medicamento comercial, na apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, solubilizadas em acetonitrila:tampão fosfato 50:50 (v/v), demonstrando alteração no pH do tampão fosfato, sendo pH 2,8, pH 3,0 (mesma condição do modelo) e pH 3,2.	129

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Preparo das soluções amostra C dos modelos multivariados, concentrações finais de leitura e percentual absoluto em relação ao valor original, para apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.	69
QUADRO 2 - Preparo das soluções amostra C dos modelos multivariados, concentrações finais de leitura e percentual absoluto em relação ao valor original, para apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.	73
QUADRO 3 - Excipientes da fórmula base do medicamento comercial (*Somente para as apresentações 5 + 50 mg e 5 + 100 mg).....	90
QUADRO 4 - Concentrações das soluções amostra C que compõem o conjunto de validação externa do modelo multivariado por PLS2 para a apresentação comercial 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.	106
QUADRO 5 - Concentrações das soluções amostra F que compõem o conjunto de validação externa do modelo multivariado por PLS2 para a apresentação comercial 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.	107
QUADRO 6 - Concentrações das soluções amostra C que compõem o conjunto de validação externa dos modelos multivariados por PLS1 para a apresentação comercial 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.	115
QUADRO 7 - Concentrações das soluções amostra F que compõem o conjunto de validação externa dos modelos multivariados por PLS1 para a apresentação comercial 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico	122

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório (>18 anos).....	27
TABELA 2 - Nova classificação da pressão arterial	27
TABELA 3 - Classificação dos testes de validação, segundo sua finalidade	50
TABELA 4 - Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade	50
TABELA 5 - Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.....	54
TABELA 6 - Alguns fatores que podem ser avaliados para o teste de robustez	62
TABELA 7 - Gradiente utilizado nas análises por CLAE	75
TABELA 8 - Quantificação dos fármacos determinada por CLAE nos testes com mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v) durante a escolha do solvente para análises por espectroscopia na região do ultravioleta (n = 3)	96
TABELA 9 - Quantificação dos fármacos determinada por CLAE nos testes com solvente metanol durante a escolha do solvente para análises por espectroscopia na região do ultravioleta (n = 3).....	96
TABELA 10 - Quantificação dos fármacos determinada por CLAE nos testes com solvente água e misturas metanol:água durante a escolha do solvente para análises por espectroscopia na região do ultravioleta (n = 3).....	97
TABELA 11 - Quantificação dos fármacos determinada por CLAE nos testes com solvente etanol e mistura etanol:água durante a escolha do solvente para análises por espectroscopia na região do ultravioleta (n = 3).....	98
TABELA 12 - Quantificação dos fármacos determinada por CLAE nos testes com mistura etanol:acetonitrila 90:10 (v/v) durante a escolha do solvente para análises por espectroscopia na região do ultravioleta (n = 3)	99
TABELA 13 - Percentuais de quantificação na validação externa para modelos de calibração multivariada com diferentes pré-processamentos e quatro variáveis latentes	109

TABELA 14 - Percentuais de variância capturados pelo modelo multivariado PLS2 para a apresentação comercial contendo 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico	110
TABELA 15 - Erros de previsão para o modelo PLS2 da apresentação comercial 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico	110
TABELA 16 - Percentuais de quantificação do losartano potássico e do besilato de anlodipino obtidos na validação externa para o modelo multivariado PLS2 escolhido, do medicamento comercial na apresentação 2,5 + 50 mg	112
TABELA 17 - Resultados percentuais de quantificação na validação do modelo multivariado PLS2 do medicamento comercial na apresentação 2,5 + 50 mg	113
TABELA 18 - Percentual de variância capturada pelos modelos multivariados PLS1 para a apresentação comercial contendo 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico	116
TABELA 19 - Erros de previsão para os modelos PLS1 da apresentação comercial 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico	116
TABELA 20 - Resultados percentuais de quantificação na validação do modelo multivariado PLS1 do medicamento comercial na apresentação 2,5 + 50 mg	117
TABELA 21 - Percentual de variância capturada pelo modelo multivariado PLS2 para a apresentação comercial contendo 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico	119
TABELA 22 - Erros de previsão para o modelo PLS2 da apresentação comercial 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico	119
TABELA 23 - Resultados da validação do modelo multivariado do tipo PLS2 do medicamento comercial, na apresentação 5 + 50 mg	121
TABELA 24 - Percentual de variância capturada pelos modelos multivariados PLS1 para a apresentação comercial contendo 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico	123
TABELA 25 - Erros de previsão para os modelos PLS1 da apresentação comercial 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico	123

TABELA 26 - Resultados dos valores médios de previsão, com respectivo desvio padrão relativo, da quantificação pelos modelos multivariados PLS1 para a avaliação da precisão - repetitividade	125
TABELA 27 - Resultados dos valores médios de previsão, com respectivo desvio padrão relativo, da quantificação pelos modelos multivariados PLS1 para a avaliação da precisão - precisão intermediária	126
TABELA 28 - Resultados dos valores médios de previsão, com respectivo desvio padrão relativo, da quantificação pelos modelos multivariados PLS1 para a avaliação da exatidão	128
TABELA 29 - Resultados dos valores médios de previsão, com respectivo desvio padrão relativo, da quantificação pelos modelos multivariados PLS1 para a avaliação das análises de robustez relacionada ao pH da solução tampão	130
TABELA 30 - Resultados dos valores médios de previsão, com respectivo desvio padrão, da quantificação pelos modelos multivariados PLS1 para a avaliação das análises de robustez relacionada à temperatura de leitura	131
TABELA 31 - Resultados dos valores médios de previsão, com respectivo desvio padrão relativo, da quantificação pelos modelos multivariados PLS1 para a avaliação das análises de robustez relacionada à estabilidade da solução de validação D	133
TABELA 32 - Resultados dos valores médios de quantificação para o losartano potássico, com respectivo desvio padrão relativo, pelo modelo multivariado PLS1 para a avaliação da robustez relacionada à estabilidade da solução padrão diluída	134
TABELA 33 - Resultados dos valores médios de quantificação para o besilato de anlodipino, com respectivo desvio padrão relativo, pelo modelo multivariado PLS1 para a avaliação da robustez relacionada à estabilidade da solução padrão diluída	134
TABELA 34 - Dados percentuais comparativos, com respectivo desvio padrão relativo, do medicamento comercial, na apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, demonstrando sua equivalente capacidade preditiva	135

LISTA DE SIGLAS

ANN	<i>Artificial neural networks</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BA	Besilato de anlodipino
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMD	Concentração média determinada
CV	Coeficiente de variação
DOQ - CGCRE	Documento orientativo - Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO
DOSC	<i>Direct orthogonal signal correction</i>
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
GA	<i>Genetic algorithm</i>
ICH	<i>International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO/IEC	<i>Internacional Standard Organization/Internacional Electrotechnical Commission</i>
LP	Losartano potássico
MSEP	<i>Mean Square Error of Prediction</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Principal Component Regression</i>
PLS ou PLSR	<i>Partial Least Square Regression</i>
RMSEC	<i>Root Mean Square Error of Calibration</i>
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Cross-Validation</i>
RMSEP	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i>
VL	Variáveis latentes
v/v	volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	25
3	REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1	HIPERTENSÃO ARTERIAL	26
3.2	TERAPÊUTICA	28
3.2.1	Losartano potássico	31
3.2.2	Anlodipino.....	33
3.2.3	Associação de losartano potássico e besilato de anlodipino.....	35
3.3	MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	35
3.3.1	Espectroscopia no ultravioleta.....	37
3.4	CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....	39
3.5	VALIDAÇÃO ANALÍTICA	47
3.5.3	Intervalo.....	55
3.5.4	Precisão	56
3.5.4.2	Precisão intermediária.....	57
3.5.4.3	Reprodutibilidade	58
3.5.5	Limite de detecção	59
3.5.6	Limite de quantificação.....	60
3.5.7	Exatidão	60
3.5.8	Robustez	62
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
4.1	MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....	63
4.2	MÉTODOS	65
4.2.1	Preparo das soluções padrões e amostras	65
4.2.1.1	Soluções empregadas para a apresentação 2,5 mg + 50 mg	65
4.2.1.1.1	Soluções padrão de losartano potássico.....	65
4.2.1.1.2	Soluções padrão de besilato de anlodipino	66
4.2.1.1.3	Soluções amostra.....	67
4.2.1.1.4	Solução de validação	68
4.2.1.2.1	Soluções padrão de losartano potássico	70
4.2.1.2.2	Soluções padrão de besilato de anlodipino.....	70
4.2.1.2.3	Soluções amostra.....	71

4.2.1.2.4 Solução de validação	72
4.2.4 Espectroscopia na região do ultravioleta	77
4.2.4.1 Escolha do solvente para análises de espectroscopia na região do ultravioleta	78
4.2.4.1.1 Teste com mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).....	79
4.2.4.1.2 Testes com metanol	80
4.2.4.1.3 Teste com água e misturas metanol:água.....	81
4.2.4.1.4 Teste com etanol e mistura etanol:água.....	81
4.2.4.1.5 Teste com mistura etanol:acetonitrila	81
4.2.4.1.6 Escolha do solvente de diluição	82
4.2.5 Calibração multivariada - modelamento e validação	82
4.2.6 Análise estatística	83
4.2.7 Validação do modelo de calibração multivariada	83
4.2.7.1 Precisão	85
4.2.7.1.1 Repetitividade.....	85
4.2.7.2 Exatidão	86
4.2.7.3 Robustez	87
4.2.7.3.1 Robustez relacionada ao pH	87
4.2.7.3.2 Robustez relacionada à temperatura de leitura	88
4.2.7.3.3 Robustez relacionada à estabilidade dos fármacos na solução de leitura.....	88
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
5.1 QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS PRESENTES NO MEDICAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	90
5.2 ANÁLISES PRELIMINARES NO ESPECTRÔMETRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	92
5.3 ANÁLISES NO ESPECTROFOTÔMETRO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA.....	94
5.3.1 Escolha do solvente	94
5.3.1.1 Teste com mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).....	95
5.3.1.2 Testes com metanol	96
5.3.1.3 Testes com água e misturas metanol:água.....	97
5.3.1.4 Teste com etanol e mistura etanol:água.....	98
5.3.1.5 Teste com mistura etanol:acetonitrila.....	98

5.3.1.6 Escolha do solvente de diluição	99
5.3.2 Obtenção dos dados espectrais para os conjuntos de dados para calibração multivariada.....	101
5.3.2.1 Obtenção dos dados espectrais do conjunto de amostras para o modelo de calibração multivariada para a apresentação farmacêutica comercial 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico	103
5.3.2.2 Obtenção dos dados espectrais do conjunto de amostras para o modelo de calibração multivariada para a apresentação farmacêutica comercial 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico	104
5.4 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....	105
5.4.1 Escolha do conjunto de validação externa para PLS2 para as apresentações comercial 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico e 5 mg de lanlodipino + 50 mg de losartano potássico.....	105
5.4.2 Montagem e escolha do melhor modelo de calibração multivariada	108
5.4.2.1 Quantificação dos fármacos besilato de anlodipino e losartano potássico no medicamento comercial, apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.....	108
5.4.2.2 Quantificação dos fármacos besilato de anlodipino e losartano potássico no medicamento comercial, apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.....	118
5.4.2.2.1 Validação dos modelos dos fármacos besilato de anlodipino e losartano potássico no medicamento comercial, na apresentação de 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, para modelos PLS1	125
5.4.2.2.2 Comparação entre os dados obtidos por diferentes metodologias para quantificação dos fármacos besilato de anlodipino e losartano potássico no medicamento comercial, apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico	135
6 CONCLUSÕES	136
7 REFERÊNCIAS	138

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é considerada um grande problema de saúde pública tanto no âmbito mundial quanto nacional (CHOBANIAN *et al.*, 2003; BRASIL, 2009). Os números de portadores dessa patologia chegam a dois terços da população (CHOBANIAN *et al.*, 2003; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010). Esses números elevam os gastos tanto para o tratamento da doença quanto das complicações decorrentes desta, como os acidentes vasculares cerebrais e infartos do miocárdio, entre outros (BRASIL, 2009).

Vários são os estudos clínicos que tratam da hipertensão arterial, que levam em conta a utilização tanto de medicamentos isoladamente, na chamada monoterapia, assim como aqueles utilizando associações de medicamentos, as terapias combinadas. Como mais de 60% dos portadores de hipertensão não respondem bem à monoterapia, já existe uma forte tendência à utilização da terapia combinada como terapia de primeira escolha (BROWN *et al.*, 2003; KOHLMANN JR *et al.*, 2006; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; NIEMEIJER; CLEOPHAS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010).

A utilização da terapia combinada traz vários benefícios para o paciente, como a diminuição de vezes que o paciente deve retornar ao médico para o controle dos níveis pressóricos, a diminuição de tomadas de medicação no dia, o controle da pressão arterial em um período de tempo mais curto, maior segurança devido às menores doses empregadas dos medicamentos envolvidos e menor incidência de efeitos adversos, entre outros. Tudo isso contribui de forma significativa para a adesão ao tratamento, que é fator imprescindível para a manutenção de níveis adequados da pressão arterial, bem como para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes (BROWN *et al.*, 2003; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010).

Atualmente, existem diversas associações no mercado de fármacos anti-hipertensivos. Alguns exemplos são as associações de ramipril e anlodipino (NAPRIX A®, Libbs), enalapril e hidroclorotiazida (CO-RENITEC®, Merck, Sharp & Dome), captopril e hidroclorotiazida (LOPRIL D®, Bristol), enalapril e anlodipino (ATMOS®, Eurofarma), entre outras. Em 2003, a associação de anlodipino e losartano foi introduzida no mercado brasileiro, com o nome de LOTAR®, do

laboratório Biossintética. Um estudo clínico realizado durante um ano no Brasil revelou que essa associação apresenta segurança, tolerabilidade e eficácia no longo prazo (KOHLMANN JR *et al.*, 2006).

A qualidade desses medicamentos, assim como de qualquer outro, deve sempre ser assegurada, para garantir a eficácia e segurança do tratamento.

Até o presente momento, para besilato de anlodipino e losartano potássico, não há métodos para o controle de qualidade como produtos acabados descritos nas farmacopéias, apenas como matérias-primas (PORTUGAL, 2002; THE UNITED States Pharmacopeia, 2006; BRITISH Pharmacopoeia 2007, 2007). Na literatura, foram encontrados trabalhos de quantificação simultânea dos fármacos, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (PEDROSO *et al.*, 2009; PATIL *et al.*, 2009a) e espectroscopia na região do ultravioleta, utilizando métodos univariados para a quantificação (PATIL *et al.*, 2009b; RAKESH *et al.*, 2010).

Uma ferramenta muito útil e que vem sendo bastante difundida na química analítica, é a calibração multivariada. Com o advento dessa ferramenta, é possível correlacionar os diferentes fatores que estão presentes numa amostra, especialmente quando trabalhamos com amostras complexas, como um medicamento. As espectroscopias são grandemente beneficiadas dessa ferramenta, pois com o seu uso, é possível utilizar mais de um comprimento de onda, por exemplo, para a quantificação de uma substância, sendo comum o uso de grandes regiões do espectro, ou até mesmo o espectro inteiro, o que representa uma maior confiabilidade para a quantificação (FERREIRA *et al.*, 1999).

Portanto, pelo exposto acima, esse trabalho se justifica pela necessidade de desenvolver metodologia para a quantificação simultânea dos fármacos na associação medicamentosa besilato de anlodipino e losartano potássico, utilizando a espectroscopia na região do ultravioleta associada à calibração multivariada.

Outro fator importante considerado foi a constante busca por metodologias que, além de eficazes, fossem também ecologicamente corretas, ou seja, que possam gerar uma menor quantidade de resíduos, ou ainda, resíduos menos tóxicos ao ambiente. A utilização de métodos espectroscópicos que gerem pouco ou nenhum resíduo, associados à calibração multivariada, poderiam atender a esses requisitos.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia para a quantificação dos fármacos besilato de anlodipino e losartano potássico em associação farmacêutica de anti-hipertensivos, utilizando métodos espectroscópicos, com o emprego de calibração multivariada.

Para atingir esse objetivo, seria necessário quantificar os fármacos presentes na associação de anlodipino e losartano potássico, nas apresentações 2,5 mg + 50 mg e 5 mg + 50 mg, respectivamente, através da metodologia por CLAE já estabelecida (PEDROSO *et al.*, 2009); desenvolver metodologia para quantificação dos fármacos nas associações, por espectroscopia na região do infravermelho com reflectância difusa e espectroscopia na região do ultravioleta, utilizando calibração multivariada para o tratamento dos dados espectrais obtidos; e validar os modelos de calibração multivariada baseando-se nas normas vigentes para validações de métodos analíticos que utilizam modelos univariados de calibração (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010; LABCOMPLIANCE, 2010).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A pressão arterial é o produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica. A hipertensão arterial ocorre quando as pressões sistólica e diastólica estão acima dos valores considerados normais, em geral maiores que 140 mmHg e 90 mmHg, respectivamente (BRUNTON; PARKER, 2008; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

A hipertensão arterial é uma das doenças cardiovasculares mais preocupantes no mundo, estando diretamente relacionada com os índices de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares (BRASIL, 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

No Brasil, a hipertensão arterial é considerada a doença cardiovascular mais frequente e como consequência, a maior causa de mortalidade, além de ser responsável por um alto número de internações, decorrentes não somente da doença em si, mas de suas complicações, sendo as mais comuns o infarto do miocárdio, os acidentes vasculares cerebrais e a doença renal crônica. Tudo isso é responsável por uma elevação dos custos de tratamento para o Sistema de Saúde (BRASIL, 2009).

Tomando por base uma pesquisa realizada em 2008, que estima que cerca de 33 milhões de brasileiros acima de 18 anos sejam portadores diagnosticados de hipertensão arterial, o Ministério da Saúde desenvolveu um sistema informatizado para o cadastro e acompanhamento desses pacientes (BRASIL, 2009). Entretanto, dados mundiais revelam que a hipertensão arterial tem sido subdiagnosticada, assim como subtratada (NIEMEIJER; CLEOPHAS, 2009).

Os limites de pressão arterial considerados normais são arbitrários e a presença de fatores de risco deve ser levada em conta durante a avaliação dos pacientes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE

BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

No Brasil, os limites de pressão arterial são considerados conforme a **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

TABELA 1 - Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório (>18 anos)

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe	130 – 139	85 – 89
Hipertensão estágio 1	140 – 159	90 – 99
Hipertensão estágio 2	160 – 179	100 – 109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90

Quando as pressões sistólica e diastólica de um paciente situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação da pressão arterial.

FONTE: SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010.

Mundialmente, o National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP) Coordinating Committee (CHOBANIAN *et al.*, 2003), através de estudos, define os diferentes estágios de pressão arterial de acordo com a **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

TABELA 2 - Nova classificação da pressão arterial

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Normal	< 120	< 80
Pré-Hipertensão	120 – 139	80 – 89
Hipertensão estágio 1	140 – 159	90 – 99
Hipertensão estágio 2	≥ 160	≥ 100

FONTE: CHOBANIAN *et al.*, 2003.

Vários estudos e guias nacionais e internacionais comprovaram que a manutenção de limites de pressão arterial inferiores a 130/85 mmHg, contribuem na prevenção de doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais (AVC's), infartos do miocárdio, entre outros, contribuindo para a diminuição dos gastos do

Sistema de Saúde, além de melhorar a qualidade de vida dos pacientes e seus familiares (LINDHOLM *et al.*, 2002; BROWN *et al.*, 2003; CHOBANIAN *et al.*, 2003; LAW *et al.*, 2003; KOHLMANN JR *et al.*, 2006; MANCIA *et al.*, 2007; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010; PAREEK *et al.*, 2010; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

3.2 TERAPÊUTICA

A terapêutica a ser adotada para cada paciente varia e leva em conta uma estratificação de risco, que avalia os valores da pressão arterial, a presença de fatores de risco cardiovascular, lesões em órgãos-alvo, as doenças cardiovasculares presentes e, também, a meta mínima de valores de pressão arterial que deve ser atingida com o tratamento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

Em todos os estágios de hipertensão, o tratamento não medicamentoso é indicado e está relacionado com hábitos alimentares saudáveis, prática de exercícios físicos, diminuição da obesidade e evitar o consumo de álcool e tabaco. Entretanto, esse tipo de tratamento é indicado como único controle para pressão arterial somente quando não há riscos cardiovasculares adicionais presentes. Já quando o risco adicional é baixo, o tratamento não medicamentoso é indicado durante seis meses. Após esse período, uma nova avaliação deve ser realizada e se a meta não foi atingida, inicia-se o tratamento medicamentoso. O tratamento medicamentoso é indicado inicialmente nos casos onde há um risco adicional médio ou alto (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

As classes de fármacos que podem ser utilizadas no controle da hipertensão arterial são os diuréticos (divididos em tiazídicos, de alça e poupadores de potássio), os inibidores adrenérgicos (os de ação central, os betabloqueadores, os alfabloqueadores e os alfa e betabloqueadores), os bloqueadores dos canais de cálcio (fenilalquilaminas, benzotiazepinas e di-hidropiridinas), os inibidores da

enzima conversora da angiotensina, os bloqueadores do receptor AT₁ da angiotensina II e os vasodilatadores diretos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

A monoterapia é indicada como terapia de primeira escolha pelos diferentes guias nacionais e mundiais (CHOBANIAN *et al.*, 2003; MANCIA *et al.*, 2007; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010). Entretanto, ela se mostra ineficaz em grande parte dos casos, não atingindo as metas de redução da pressão arterial aos níveis desejados (ESCOBAR; BARRIOS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010). Nesses casos, a terapia combinada é indicada pelos guias para o tratamento inicial em estágios onde a pressão arterial é mais elevada, ou onde os riscos cardiovasculares são maiores (CHOBANIAN *et al.*, 2003; MANCIA *et al.*, 2007; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

Como cerca de dois terços dos pacientes não respondem à monoterapia inicial, já é observada uma tendência à introdução precoce da terapia combinada como terapia de primeira escolha, especialmente para pacientes com hipertensão arterial em estágios 2 e 3 (KOHLMANN JR *et al.*, 2006; ESCOBAR; BARRIOS, 2009). São vários os estudos que demonstram a eficácia dessa terapia combinada (LAW *et al.*, 2003; KOHLMANN JR *et al.*, 2006; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; NIEMEIJER; CLEOPHAS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010; PAREEK *et al.*, 2010). Alguns, até mesmo defendem a expansão do uso da terapia combinada como terapia de primeira escolha, dados os benefícios adicionais que o controle da pressão arterial promove aos pacientes (BROWN *et al.*, 2003; LAW *et al.*, 2003; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010).

A escolha dos fármacos anti-hipertensivos em associação deve levar em conta os mecanismos de ação das diferentes classes anti-hipertensivas disponíveis. Esses mecanismos de ação, sempre que possível, devem ser complementares, o que acarreta doses menores dos fármacos, diminuindo os efeitos adversos de cada fármaco (PAREEK *et al.*, 2010). Muitos estudos demonstraram que a terapia combinada tem efeitos farmacêuticos aditivos dos fármacos presentes, enquanto a presença de efeitos adversos segue o caminho oposto, chegando algumas vezes ao

desaparecimento de certos efeitos adversos (BROWN *et al.*, 2003; LAW *et al.*, 2003; KOHLMANN JR *et al.*, 2006; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010; PAREEK *et al.*, 2010).

Essas associações devem levar em conta vários fatores, como a meta de pressão a ser atingida e os efeitos adversos possíveis, existindo estudos que relataram quais as associações de classes de anti-hipertensivos podem ser consideradas preferenciais (as mais efetivas e com menor risco de efeitos adversos), aceitáveis e menos efetivas (devendo ser evitadas e utilizadas com precauções) (BROWN *et al.*, 2003; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010).

Medicamentos contendo associações de fármacos em dose fixa já existem no mercado, visando reduzir o número de comprimidos que devem ser tomados pelo paciente. Nesses casos, dois ou mais fármacos com ação anti-hipertensiva estão associados, numa única forma farmacêutica. Os benefícios relacionados a essas combinações fixas vão desde a melhora na adesão ao tratamento, um controle mais efetivo da pressão arterial, diminuição da necessidade de visitas ao médico para controlar os valores da pressão arterial, além de economia financeira (BROWN *et al.*, 2003; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010).

Essas associações de dose fixa, além de possuir os benefícios já citados, devem possuir estudos e atender às seguintes condições: os fármacos associados devem gerar uma melhor resposta terapêutica que os fármacos quando administrados em separado ou um dos fármacos deve a incidência de efeitos adversos do outro (BRUNTON; PARKER, 2008).

Uma dessas associações de dose fixa é o LOTAR® (Biossintética), combinação de besilato de anlodipino, um bloqueador dos canais de cálcio di-hidropiridínico, e de losartano potássico, um bloqueador do receptor AT₁ da angiotensina II, que pode ser encontrado em três apresentações farmacêuticas, sendo 2,5 mg + 50 mg, 5 mg + 50 mg e 5 mg + 100 mg de anlodipino + losartano potássico, respectivamente.

A ação anti-hipertensiva do anlodipino é devida à redução da resistência vascular periférica. O losartano potássico possui um importante efeito hipotensor, além de efeitos natriurético, antiproliferativo e anti-aterosclerótico (KOHLMANN JR *et al.*, 2006; PAREEK *et al.*, 2010; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010). Seu efeito adverso mais pronunciado é a presença de edema

nos membros inferiores. Esse edema se dá devido ao desequilíbrio das forças hidrostáticas que atuam nos capilares periféricos, pois o anlodipino promove uma vasodilatação arterial potente, porém não apresenta vasodilatação venosa com a mesma efetividade, o que facilita o extravasamento de um exudato nos espaços intersticiais. E esse efeito adverso é comumente relatado como causa de abandono de tratamento. Para evitá-lo, há algumas possibilidades, como diminuir a dose empregada pela metade, o que nem sempre é suficiente para o controle da pressão arterial, ou associar o anlodipino a uma classe de anti-hipertensivos que promova venodilatação (KOHLMANN JR *et al.*, 2006; NIEMEIJER; CLEOPHAS, 2009; PAREEK *et al.*, 2010). Nesse caso, o losartano pode ser utilizado para diminuição do edema, uma vez que promove uma vasodilatação tanto venosa quanto arterial, equilibrando as forças hidrostáticas e evitando a formação do edema (KOHLMANN JR *et al.*, 2006; ESCOBAR; BARRIOS, 2009).

Um estudo clínico desenvolvido no Brasil num período de um ano demonstrou alta eficácia no longo prazo desta associação farmacêutica. Também foi verificado que a associação possui eficácia superior quando comparado às monoterapias isoladamente, assim como uma boa tolerabilidade, com baixa incidência de efeitos adversos, além de promover um melhor controle da pressão arterial. Esses fatores quando combinados, podem favorecer a adesão ao tratamento (KOHLMANN JR *et al.*, 2006).

3.2.1 Losartano potássico

O losartano potássico é um bloqueador do receptor AT₁ da angiotensina II (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010). Tem demonstrado um efeito superior aos fármacos prévios dessa classe e também aos inibidores da enzima conversora da angiotensina devido à melhor especificidade, seletividade e tolerabilidade (BONFILIO *et al.*, 2009a). Estudos com fármacos dessa classe têm demonstrado que seus efeitos adversos se assemelham aos de placebo e não aumentam quando há aumento da dose utilizada (KOHLMANN JR *et al.*, 2006).

Sua biodisponibilidade oral é baixa e apresenta alta variabilidade, além de alta solubilidade e baixa permeabilidade (BONFILIO *et al.*, 2009a).

É administrado na sua forma ativa, sendo parcialmente convertido no metabólito EXP3174 (ácido 2-*n*-butil-4-cloro-1-[(2'-(1-*H*-tetrazol-5-il)difenil-4-il)metil]imidazol-5-carboxílico), também ativo, que é responsável pelo efeito farmacológico prolongado (TAMAKI *et al.*, 1997) e é cerca de 40 vezes mais potente que o princípio ativo (PEDROSO, 2009).

O losartano potássico, quimicamente o sal monopotássico do 2-*n*-butil-4-cloro-5-hidroximetil-1-[(2'-(1-*H*-tetrazol-5-il)difenil-4-il)metil]imidazol (TAMAKI *et al.*, 1997), apresenta a fórmula molecular $C_{22}H_{22}ClKN_6O$, com uma massa molecular de 461 g/mol (BONFILIO *et al.*, 2009a). A fórmula estrutural está representada na FIGURA 1.

O losartano potássico apresenta-se como um pó cristalino, branco ou quase branco, solúvel em solventes orgânicos polares como etanol (MERCK, 2001) e metanol e muito solúvel em água (THE UNITED States Pharmacopeia, 2006). Seu valor de pKa é de 4,9 (BONFILIO *et al.*, 2009a).

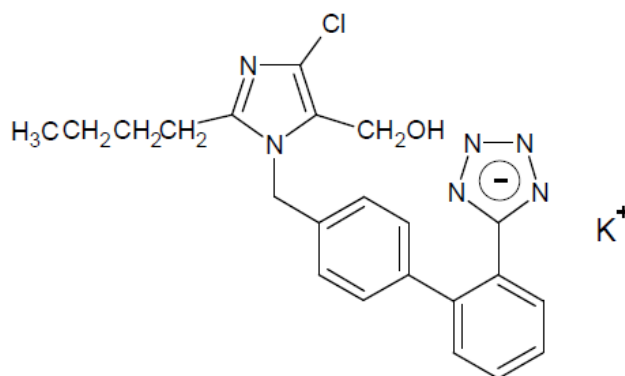


FIGURA 1 - Fórmula estrutural do losartano potássico (THE UNITED States Pharmacopeia, 2006).

Como citado anteriormente, a Farmacopéia Americana (THE UNITED States Pharmacopeia, 2006), não possui metodologia para produto acabado mas descreve uma metodologia para o controle da matéria-prima, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (coluna C18, diluição do fármaco com metanol e uma mistura de acetonitrila com solução aquosa de ácido fosfórico como fase móvel, por eluição gradiente).

Já em outras literaturas científicas foi possível encontrar metodologias desenvolvidas e validadas para o controle de formas farmacêuticas sólidas, cápsulas e comprimidos, sendo alguns métodos por cromatografia líquida (ANSARI *et al.*, 2004; BONFILIO *et al.*, 2009b) e na sua maioria, por métodos espectroscópicos (ultravioleta), simples ou por complexação (PRABHAKAR; GIRIDHAR, 2002; LASTRA *et al.*, 2003; ANSARI *et al.*, 2004; RAHMAN; SIDDIQUI; AZMI, 2006; SINGHVI; BHATIA, 2006; LATHEESHJLAL *et al.*, 2010). Entretanto, todos os métodos citados fazem uso de métodos univariados de calibração. Apenas um método, por cromatografia líquida de alta eficiência foi encontrado fazendo uso de métodos multivariados de calibração (BONFILIO *et al.*, 2009b).

Alguns trabalhos também foram encontrados para associações de losartano com outros fármacos, como atenolol e hidroclorotiazida, em comprimidos, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (KAVITHA; MURALIDHARAN, 2010) e cromatografia líquida de ultra eficiência (DURGA RAO *et al.*, 2009), clortalidona e hidroclorotiazida, em cápsulas, utilizando eletroforese capilar (BALESTEROS; FARIA; DE OLIVEIRA, 2007), atovarstatina, em comprimidos, por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (PANCHAL; SUHAGIA, 2010) e atenolol, em comprimidos, utilizando espectroscopia na região do ultravioleta (THOMAS *et al.*, 2007), sendo que alguns desses já fazem uso de métodos multivariados.

3.2.2 Anlodipino

O besilato de anlodipino é um bloqueador dos canais de cálcio di-hidropiridínico (BASAVAIAH; CHANDRASHEKAR; NAGEGOWDA, 2006). Após administração de uma dose ao dia, apresenta alto tempo de meia-vida, cerca de 45 horas, o que resulta em níveis plasmáticos elevados e consequente ação prolongada. É lentamente metabolizado no fígado, em metabólitos inativos (ROHATAGI *et al.*, 2008).

É terapeuticamente utilizada como uma mistura racêmica, das formas enantioméricas *S* e *R*, sendo seu efeito, entretanto, correspondente à forma *S*, que é cerca de mil vezes mais ativa que a forma *R* (JOSHI; KARBHARI; BHOIR, 2009).

Quimicamente, o besilato de anlodipino é o benzenossulfonato de (4*R,S*)-2-(2-aminoetoximetil)-4-(2-clorofenil)-6-metil-1,4-di-hidropiridina-3,5-dicarboxilato de 3-etil-5-metila (PORTUGAL, 2002). Sua fórmula molecular é $C_{26}H_{31}ClN_2O_8S$ e está representada na FIGURA 2.

Apresenta-se como um pó branco ou quase branco, pouco solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, ligeiramente solúvel em etanol e pouco solúvel em 2-propanol (PORTUGAL, 2002; BRITISH Pharmacopoeia 2007, 2007). Apresenta valor de pKa de 8,6 e uma massa molecular de 567 g/mol, na forma besilato (MERCK, 2001).

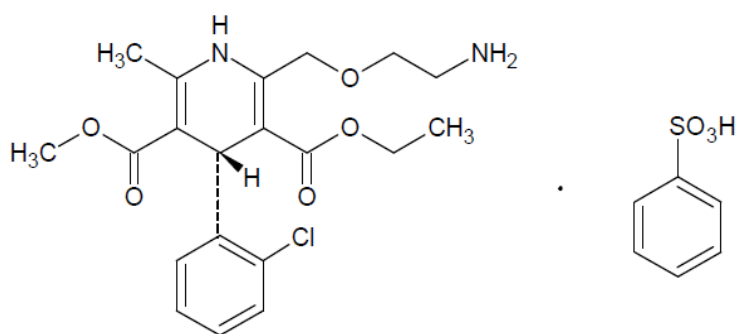


FIGURA 2 - Fórmula estrutural do besilato de anlodipino (BRITISH Pharmacopoeia 2007, 2007).

Como metodologia para a matéria-prima, a Farmacopéia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2007) recomenda o uso de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna C18, diluição do fármaco com a fase móvel, uma mistura de acetonitrila, metanol e solução aquosa de trietanolamina, ajustada com ácido fosfórico, por eluição isocrática. Novamente, nenhuma metodologia é descrita para produto acabado.

Na literatura científica, alguns dos métodos encontrados para a quantificação de besilato de anlodipino são: por eletroforese capilar, método univariado para quantificação do fármaco em comprimidos (JANKOVICS *et al.*, 2008), em associação com olmesartan, em comprimidos, por espectroscopia na região do ultravioleta, método univariado (DHABALE; BHAGADE, 2011), em associação com losartano potássico e hidroclorotiazida, em comprimidos, por cromatografia líquida de alta eficiência e espectroscopia na região do ultravioleta, método univariado (WANKHEDE *et al.*, 2010) e por espectroscopia na região do ultravioleta, método multivariado (NAGAVALLI *et al.*, 2010), entre outros.

3.2.3 Associação de losartano potássico e besilato de anlodipino

Conforme citado anteriormente, essa associação já possui estudos clínicos que comprovam sua eficácia e tolerabilidade no longo prazo (KOHLMANN JR *et al.*, 2006).

Entretanto, apenas quatro trabalhos foram encontrados na literatura sobre sua quantificação simultânea.

Pedroso e colaboradores (2009) desenvolveram e validaram uma metodologia utilizando cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação simultânea desses fármacos, utilizando método de calibração univariado.

Patil e colaboradores (2009a, 2009b) desenvolveram três métodos diferentes para a quantificação simultânea dos fármacos nessa associação. Um dos métodos, por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (PATIL *et al.*, 2009a), com modelo univariado de calibração e os outros dois, descritos num mesmo artigo, por espectroscopia na região do ultravioleta, utilizando cálculos matemáticos a partir dos dados extraídos dos espectros eletrônicos, embora ainda univariados (PATIL *et al.*, 2009b). Recentemente, Rakesh e colaboradores (2010) desenvolveram também métodos utilizando a espectrofotometria na região do ultravioleta, univariado, para esta quantificação simultânea.

3.3 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

As técnicas analíticas disponíveis atualmente são variadas e atendem as mais diversas necessidades, como sua utilização para o controle de qualidade na indústria farmacêutica, tanto para o controle de processo como para o controle do produto acabado (ALCALÀ *et al.*, 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica analítica preferida pela indústria. Entretanto, esta envolve altos custos, trabalho laboratorial intenso e muito tempo, além de gerar resíduos de difícil recuperação (ALCALÀ *et al.*, 2009).

Entre as técnicas analíticas utilizadas na quantificação de fármacos, uma das mais difundidas é a espectroscopia, que é baseada na absorção da luz ou,

melhor definindo, na absorção seletiva da radiação eletromagnética pelas substâncias, em determinados comprimentos de onda/frequências (HARRIS, 2001). Tem como vantagem, oferecer resultados satisfatórios, com custos, trabalho no preparo das amostras e geração de resíduos diminuídos (SKOOG *et al.*, 2000; PASQUINI, 2003).

A espectroscopia é a ciência que estuda as interações da radiação com a matéria (SKOOG *et al.*, 2000) e os processos que utilizam a luz para medir as concentrações químicas são conhecidos como espectrofotometria (HARRIS, 2001).

Os métodos de análise que se baseiam na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou espécies atômicas de interesse, são denominados métodos espectroscópicos e são classificados de acordo com a região do espectro eletromagnético envolvida nessa medida (SKOOG *et al.*, 2000).

O espectro eletromagnético compreende uma ampla faixa de energias e comprimentos de onda, conforme demonstrado na FIGURA 3.

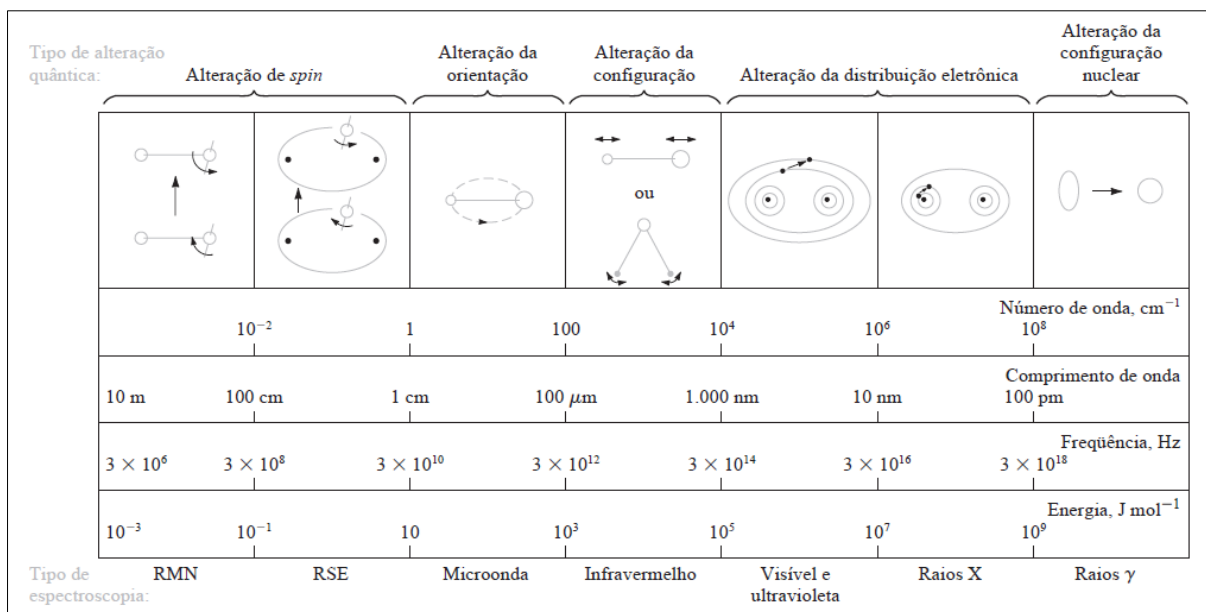


FIGURA 3 - Regiões do espectro eletromagnético com suas respectivas alterações (SKOOG *et al.*, 2000).

As regiões do ultravioleta e visível, que compreendem a absorção da luz mais ou menos entre 200 e 800 nm, estão relacionadas com as vibrações e rotações dos elétrons de ligações insaturadas entre diferentes níveis energéticos. Já a absorção da luz na região do infravermelho, está relacionada às ligações covalentes que existem na molécula e não possuem energia suficiente para promover os

elétrons a outro estado de valência, ou seja, nessa faixa do espectro, as moléculas absorvem energia devido a pequenas e rápidas vibrações de estiramento ou deformação, que ocorrem em um mesmo nível eletrônico (SOLOMONS, 1996).

De um modo resumido, podemos explicar a espectroscopia de absorção na região do ultravioleta da seguinte forma: um feixe de luz é emitido, com uma intensidade inicial; quando esse feixe de luz atravessa um caminho óptico, preenchido com uma solução do analito, ocorrem interações entre o feixe e o analito, causando a excitação do analito, ou seja, esse analito absorve parte da energia do feixe; o feixe atenuado, que sofreu perda de sua energia, será então detectado por um sistema no equipamento de medição; outro feixe de luz é emitido através de um caminho óptico idêntico, mas atravessando somente o solvente da solução, sem o analito de interesse; o equipamento faz, então, uma comparação entre a absorção nesses dois momentos, gerando uma medida (SOLOMONS, 1996).

A expressão desta medida pode ser apresentada de forma gráfica, o espectro, ou espectro eletrônico, quando tratamos de espectros na região do ultravioleta, por estarem relacionados com os elétrons excitados. Esse espectro é uma expressão gráfica da medida do comprimento de onda contra a absorvância da luz em cada comprimento de onda (SOLOMONS, 1996).

A absorvância é bastante importante para as análises que envolvem a espectroscopia na região do ultravioleta, pois ela é diretamente proporcional à concentração dos analitos nas soluções de análise (HARRIS, 2001).

Por tudo isso, informações qualitativas e quantitativas podem ser adquiridas através da espectroscopia de absorção, que mede a quantidade de luz absorvida em função do comprimento de onda (SKOOG *et al.*, 2000).

3.3.1 Espectroscopia no ultravioleta

Existe uma variedade de métodos espectroscópicos, dentre os quais, se destaca a espectroscopia na região do ultravioleta. A espectroscopia na região do ultravioleta é uma das técnicas mais amplamente empregadas na análise quantitativa de amostras, devido à robustez, ao custo relativamente baixo e também devido ao grande número de aplicações onde pode ser utilizada (ROCHA;

TEIXEIRA, 2004), como para compostos orgânicos, inorgânicos e sistemas bioquímicos. Outras características de interesse incluem boa sensibilidade, moderada a alta seletividade, razoável precisão e eficácia (SKOOG *et al.*, 2000).

A espectroscopia na região do ultravioleta é baseada na absorção da luz e nas transformações da molécula do estado fundamental para o estado excitado, ou de seu relaxamento deste último, para o estado fundamental, conforme vemos na FIGURA 4. Portanto está relacionada com a estrutura eletrônica das moléculas, ou seja, promove os elétrons de orbitais de baixa energia para orbitais de maior energia, ou seja, níveis eletrônicos diferentes (HARRIS, 2001).

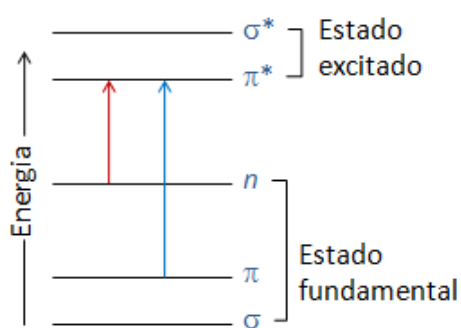


FIGURA 4 - Resumo dos níveis energéticos eletrônicos na região do ultravioleta próximo. As transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ estão representadas (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1997).

Essas interações entre níveis energéticos diferentes das espécies químicas estão intimamente relacionadas com a energia da radiação empregada e seu modo de detecção (SKOOG *et al.*, 2000).

Os grupos responsáveis pela absorção da luz nesse tipo de espectroscopia são chamados cromóforos, que são grupos insaturados (contendo elétrons π) com ou sem participação de grupos com elétrons livres (n) (FIGURA 4). É nos grupos cromóforos onde ocorre a absorção da luz ou sua emissão, que será medida nos equipamentos de espectroscopia na região do ultravioleta (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1997). Os grupos cromóforos dos fármacos em estudo são apresentados na FIGURA 5.

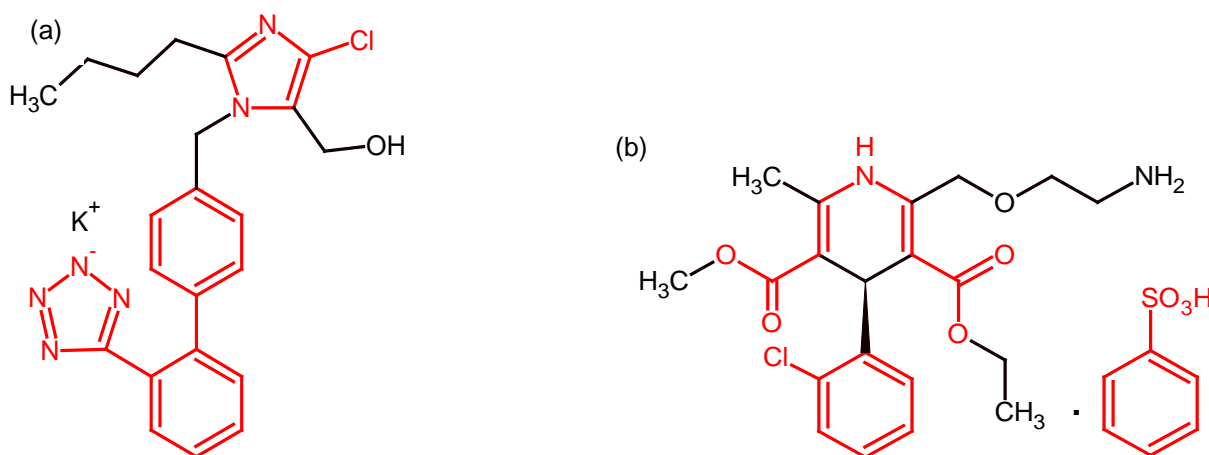


FIGURA 5 - Fórmulas estruturais do (a) losartano potássico e (b) besilato de anlodipino, destacando os grupos cromóforos, em vermelho (THE UNITED States Pharmacopeia, 2006; BRITISH Pharmacopoeia 2007, 2007).

3.4 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

A quimiometria pode ser definida como uma disciplina que se utiliza da matemática, da estatística e da lógica para desenvolver ou selecionar procedimentos experimentais ótimos, para prover o maior número de informações químicas relevantes dos dados experimentais obtidos ou ainda, para obter conhecimento sobre os sistemas químicos (FERREIRA *et al.*, 1999; HOPKE, 2003).

O desenvolvimento simultâneo de novos equipamentos analíticos, mais modernos e que produzem dados que requerem métodos de análises mais efetivos, somados à melhora da tecnologia dos computadores pessoais atuais, principalmente sua capacidade de permitir análises sofisticadas de dados, criaram novas oportunidades para a melhoria dos métodos de análises de dados. Partindo daí, a quimiometria tem emergido com papel significativo na química analítica, tendo mesmo sido incorporada nos sistemas operacionais de equipamentos analíticos (HOPKE, 2003).

Nos processos analíticos em geral, a busca pela determinação da concentração de um analito é uma constante. Essa medida geralmente é conseguida de forma indireta, relacionando uma grandeza, como absorção ou emissão da luz, condutividade, peso ou volume, com a concentração do analito pesquisado. Há ainda a necessidade de uma calibração, ou seja, uma correlação

entre medidas prévias realizadas com um padrão analítico de concentrações conhecidas e as medidas instrumentais, realizadas com as amostras teste. Esta calibração é fundamental para ensaios analíticos e determina, entre outras coisas, a aplicabilidade, exatidão e precisão, duração e custo deste ensaio (PIMENTEL; NETO, 1996).

Os modelos univariados de calibração são os mais comumente utilizados. Pode-se definir modelos univariados de calibração como aqueles onde, em um conjunto de medidas obtidas para uma amostra, uma única medida é escolhida para ser correlacionada com a concentração. Em geral, o valor de absorvância da banda correspondente ao máximo de absorção, em um único valor de comprimento de onda, será escolhido para ser correlacionado com a concentração. Mas há dois requisitos básicos que devem ser cumpridos para garantir respostas confiáveis: o primeiro é que o sinal escolhido deve representar somente o analito em estudo, não sofrendo influência de outras substâncias, ou seja, o método deve ser seletivo, e o segundo requisito é que deve haver uma relação linear entre o sinal instrumental e a concentração (BRO, 2003).

Entretanto, muitos ensaios são realizados envolvendo várias substâncias, como as análises de controle de qualidade de produto acabado. Nesses casos, podemos dizer que existem várias informações sobre a mistura, que podem ser responsáveis pelo conhecimento de cada componente e também uma série de propriedades que podem ter sido medidas (HOPKE, 2003)(HOPKE, 2003)(HOPKE, 2003). Métodos multivariados podem fazer uso dessas várias propriedades medidas, para melhorar a calibração (HOPKE, 2003).

As características espectrais como a sobreposição de bandas, demonstram a dificuldade de determinação simultânea de mais de um fármaco por métodos univariados (MAGGIO; CASTELLANO; KAUFMAN, 2008). Além disso, as variáveis em sistemas químicos geralmente apresentam fortes correlações, gerando interações importantes, com efeitos sinérgicos e antagônicos, que precisam ser levados em consideração (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

Os estudos analíticos mais recentes têm praticamente abandonado o uso de calibração baseada em um único resultado. Ao invés disso, técnicas de calibração multivariada baseadas em resultados multivariados obtidos de instrumentos analíticos, têm sido propostas para a eliminação da desvantagem de um único

resultado para o processamento (DINÇ; ÖZDEMİR, 2005; DINÇ; ÜSTÜNDAĞ, 2005).

O uso da calibração multivariada associada às técnicas espectroscópicas tem sido considerado um método promissor, rápido e relativamente barato, visando a determinação de compostos em formulações farmacêuticas. Em situações onde se torna difícil quantificar um ou mais analitos, devido à presença de interferentes, ao invés de eliminar os interferentes, o uso da calibração multivariada torna possível a quantificação destes analitos, mesmo na presença dos interferentes (SENA *et al.*, 2004). Isso faz dela uma ferramenta muito útil para o estudo dos sinais produzidos por um espectro de absorção, pronunciadamente em espectros obtidos nas regiões do ultravioleta e infravermelho (FERREIRA *et al.*, 1999; FEUDALE *et al.*, 2002).

Estatisticamente, o uso de um número infinito de resultados medidos em uma amostra torna o resultado o mais perto possível do resultado real (DINÇ; ÖZDEMİR, 2005; DINÇ; ÜSTÜNDAĞ, 2005). Dessa forma, a calibração multivariada tornou-se uma ferramenta poderosa para a determinação simultânea, porque extrai mais informações dos dados, possibilitando realizar análises sem o uso de métodos de extração e separação, e permite construir modelos mais robustos (SENA *et al.*, 2004).

Outra vantagem oferecida pelo uso da calibração multivariada é que esta permite reduzir o número de amostras necessárias para a obtenção dos resultados desejados, reduzindo, portanto, o consumo de reagentes e também o trabalho de laboratório, resultando em menores custos finais (TARLEY *et al.*, 2009).

Nas ciências farmacêuticas, as metodologias analíticas, geralmente têm o objetivo de quantificar uma espécie em estudo (analito), em uma amostra. Entretanto, os equipamentos analíticos, não costumam produzir resultados diretos da concentração desses analitos. Para tal, é comum utilizar-se de um algoritmo matemático, que seja capaz de gerar os resultados desejados, a partir dos dados experimentais obtidos. Neste caso, o que se deseja é encontrar um algoritmo que forneça a previsão da concentração do analito em estudo, a partir das respostas instrumentais medidas, sejam elas espectrais, cromatográficas, ou outras. Esse processo é denominado calibração e pode ser representado conforme a FIGURA 6 (FERREIRA *et al.*, 1999).

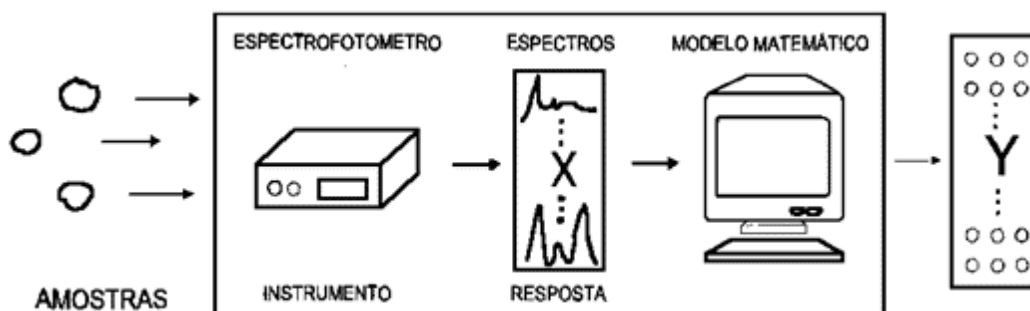


FIGURA 6 - Representação esquemática do processo de calibração (FERREIRA *et al.*, 1999).

Para dados espectrofotométricos, os dados instrumentais medidos são organizados numa matriz de variáveis independentes, denominada matriz X, representada na FIGURA 7 (a), apresentando uma amostra em cada linha e em cada coluna, as respostas instrumentais medidas (valores de absorvância) para cada comprimento de onda. Em outra matriz, denominada Y, de variáveis dependentes, os dados de concentração do analito de interesse serão inseridos, sendo que cada linha corresponde à uma amostra (correspondente à matriz X) e cada coluna corresponde à concentração do analito em pesquisa, conforme representado na FIGURA 7 (b) (FERREIRA *et al.*, 1999).

$$(a) \quad X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nm} \end{bmatrix} \quad (b) \quad Y = \begin{bmatrix} x_{11} \\ x_{21} \\ \vdots \\ x_{n1} \end{bmatrix}$$

FIGURA 7 - (a) Matriz de variáveis independentes, gerada por dados espectrofotométricos e (b) matriz de variáveis dependentes (FERREIRA *et al.*, 1999).

O processo geral de calibração inclui duas etapas, a modelagem, que objetiva estabelecer as relações matemáticas entre os resultados experimentais obtidos (matriz X) e as concentrações do analito em estudo (matriz Y), e a validação, onde o objetivo é otimizar essa relação obtida entre medida instrumental e concentração (FERREIRA *et al.*, 1999).

Em alguns casos, os dados experimentais obtidos podem apresentar uma distribuição inadequada para a análise, dificultando a extração das informações úteis e a interpretação destas informações. Medidas em diferentes unidades e variáveis

com variâncias diferentes podem levar a essa distribuição inadequada. Nesses casos, o uso de pré-processamentos nos dados experimentais originais, pode ser uma opção (FERREIRA *et al.*, 1999). Os pré-processamentos mais usuais consistem em centrar os dados na média e autoescalar os dados (FERREIRA *et al.*, 1999). Entretanto, há outros tipos de pré-processamentos, como o alisamento, a normalização, as derivações, o *detrend*, entre outros (ESCANDAR *et al.*, 2006). Dados centrados na média consistem em calcular a média das intensidades para cada comprimento de onda e subtrair esse valor médio de cada intensidade separadamente. Para autoescalar, é necessário dividir os dados centrados na média pelo desvio padrão respectivo, havendo um para cada comprimento de onda (FERREIRA *et al.*, 1999).

Ainda, há diferentes métodos multivariados que podem ser utilizados, dependendo do resultado pretendido e do tipo de amostra com que se trabalha, dentre os quais podemos citar como sendo os de uso mais comum o PCR – *principal component regression*, o PLS (ou PLSR) – *partial least square regression*, o ANN – *artificial neural network*, entre outros (FERREIRA *et al.*, 1999; BRO, 2003; HOPKE, 2003; GOODARZI *et al.*, 2009). Cada um desses métodos apresenta especificidades, que podem tornar o método mais ou menos adequado, conforme o tipo de análise requerida. Assim, a avaliação do método mais adequado deve levar em consideração informações tais como as características químicas ou estruturais do analito, por exemplo, o tipo de equipamento e os resultados experimentais obtidos (CORRER, 2004).

Os modelos de calibração linear são geralmente preferidos, porque eles são simples de aplicar e passíveis de simples interpretação físico-química. A idéia central nesses modelos é compensar a falta de seletividade do sinal analisado, usando os algoritmos para extrair a porção do sinal global que pode ser empregada de forma mais eficiente para prever a concentração de um componente particular da amostra (ESCANDAR *et al.*, 2006).

PCR e PLS não requerem que o número de amostras seja maior que o número de variáveis analisadas e também não necessitam do conhecimento preciso das concentrações de todas as substâncias presentes na amostra, ou seja, são consideravelmente mais eficientes para lidar com ruídos experimentais, colinearidades e pequenas não linearidades. Nos modelos via PCR ou PLS, todas as variáveis relevantes são incluídas, o que significa que a calibração pode ser

realizada eficientemente mesmo na presença de interferentes, não havendo necessidade do conhecimento do número nem da natureza dos mesmos (FERREIRA *et al.*, 1999; ESCANDAR *et al.*, 2006).

Entretanto, o PCR não leva em conta as informações de concentração para construir o modelo, o que pode causar uma fragilidade no método quando um dos analitos não tem um sinal intenso, pois não influencia as primeiras componentes principais e pode ser necessário um número maior delas, para a construção do modelo. Essa dificuldade é facilmente contornada utilizando-se o PLS (FERREIRA *et al.*, 1999).

O PLS é o método de calibração multivariada mais difundido (SENA *et al.*, 2004). Este método tem sido empregado na resolução de misturas complexas, para aplicações das mais variadas, incluindo as análises farmacêuticas, devido à sua rapidez, aparente simplicidade e por levar em consideração, os resultados espectrais e os valores de concentração dos analitos durante os estágios de regressão (MAGGIO; CASTELLANO; KAUFMAN, 2008).

Quando um modelo PLS é montado, utilizando na matriz Y dois ou mais componentes, ou seja, quando se busca a quantificação de dois ou mais componentes, esse método é chamado PLS2. Da mesma forma, quando a matriz Y é composta por apenas um componente de interesse, esse modelo é chamado PLS1 (BRERETON, 2000; SENA *et al.*, 2004). Utilizando os mesmos dados experimentais e montando diferentes modelos, verifica-se diferenças na previsão das concentrações estimadas para os analitos em estudo, quando se utiliza PLS1 e PLS2, o que demonstra a influência da concentração nesse tipo de modelamento. Em alguns casos, a estimativa da concentração no PLS2 é pior do que aquela estimada por PLS1. Entretanto, PLS2 fornece informações úteis, como a faixa espectral que pode ser mais significativa e quais concentrações podem ser determinadas com maior grau de confiança. Dessa forma, utilizar PLS2 para montar um modelo multivariado inicial pode ser uma boa estratégia para, posteriormente, montar modelos utilizando PLS1 que forneçam melhores resultados de previsão (PASQUINI, 2003).

O método PCA – *principal component analysis*, é a base de grande parte dos métodos multivariados e consiste na construção de um novo sistema de eixos, conhecidos como componentes principais ou variáveis latentes, que permite a visualização dos dados em poucas dimensões (FERREIRA *et al.*, 1999). A função

dessas variáveis latentes é basicamente descrever a variação ou espalhamento entre as amostras, partindo da definição de novos eixos, que se alinhem mais com os dados, conforme o que se pode ver na FIGURA 8.

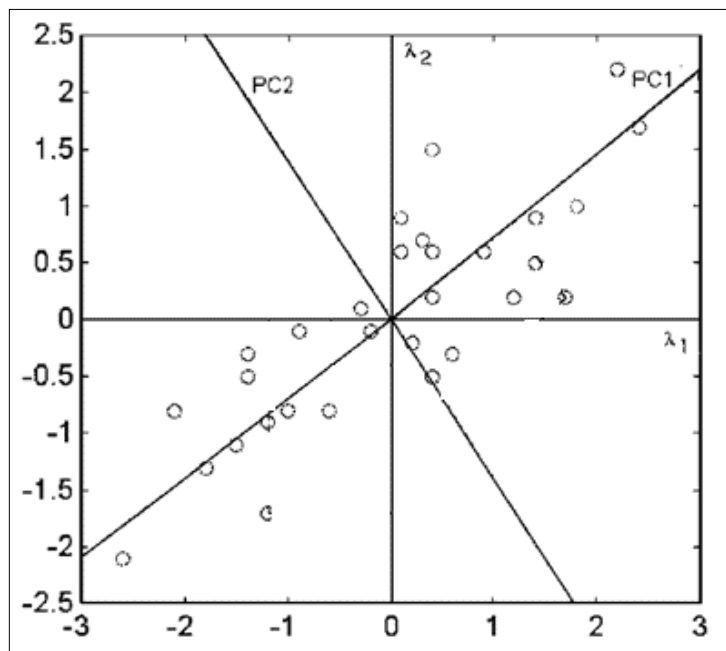


FIGURA 8 - Gráfico de um conjunto de dados bidimensionais, λ_1 e λ_2 , demonstrando os eixos das variáveis latentes, PC1 e PC2 (FERREIRA et al., 1999)

Ao montar um modelo de calibração multivariada, deve-se tomar cuidado com a escolha do número de variáveis latentes. Essa escolha, que pode ser realizada pelo software utilizado, deve ser avaliada pelo operador, para evitar que um grande número de variáveis latentes seja escolhido e cause prejuízo nas previsões realizadas pelo modelo. Durante a montagem do modelo, cada número de variáveis latentes explica uma porção dos dados utilizados, chamada de variabilidade. Com o aumento do número de variáveis latentes, a explicação dessa variabilidade aumenta, incluindo aqui, a chance de um ruído ser explicado por uma variável latente, por exemplo. Dessa forma, a avaliação do operador é indispensável. Para essa avaliação, o uso de um conjunto de amostras externa pode ser utilizado. A avaliação das diferenças entre os resultados finais previstos pelo modelo e os valores de referência é uma forma segura de otimizar o número de variáveis latentes a serem escolhidos (PASQUINI, 2003).

Além da utilização de um conjunto de amostras externas ao modelo, uma validação cruzada pode ser utilizada na busca da otimização do número de variáveis

latentes a ser escolhido para a montagem do modelo (PASQUINI, 2003). Na validação cruzada, cada amostra é retirada do modelo, o modelo é construído novamente e essa amostra que foi retirada é utilizada para uma previsão da concentração do analito. O erro de previsão é calculado. Esse procedimento é feito para todas as amostras do modelo. A soma dos quadrados dos erros de previsão é feita. Quando o valor dessa soma apresentar o menor valor, este pode ser avaliado como o melhor número de variáveis latentes (FERREIRA *et al.*, 1999).

Além do número de variáveis latentes, a detecção das anomalias é um fator determinante para a capacidade preditiva do modelo (FERREIRA *et al.*, 1999; PASQUINI, 2003).

A detecção das anomalias (do inglês *outliers*) garante a utilização de um conjunto homogêneo de amostras. Há recomendação para a retirada de amostras anômalas do modelo (FERREIRA *et al.*, 1999), assim como para a inserção de mais amostras neste, com o intuito de possibilitar que essa amostra anômala se torne uma amostra homogênea (PASQUINI, 2003). Essa detecção ocorre através da avaliação de duas grandezas complementares: a *leverage* e o resíduo de Student (FERREIRA *et al.*, 1999).

A *leverage* determina a influência da amostra no modelo multivariado, podendo ser interpretada, geometricamente, como a distância de uma amostra ao centróide do conjunto de dados. Valores pequenos de *leverage* indicam que a amostra em questão influi pouco na construção do modelo de calibração, ou seja, não requer mais uma variável latente para sua explicação (FERREIRA *et al.*, 1999).

O resíduo de Student verifica se a amostra está ou não dentro de uma distribuição normal dos dados, com um nível de confiança de 95%. Como a unidade de desvio padrão do valor médio é utilizada para definir esse parâmetro, os valores para o resíduo de Student são definidos como $\pm 2,5$. Valores acima destes, são considerados anomalias (FERREIRA *et al.*, 1999).

Uma validação, utilizando amostras que não foram utilizadas na construção do modelo, é o passo final para garantir a capacidade preditiva deste. A utilização dessas amostras externas produz dados mais confiáveis (PASQUINI, 2003).

Quando o modelo for utilizado para a previsão de novas amostras, estas devem estar na faixa de concentração das amostras utilizadas para a construção do modelo (FERREIRA *et al.*, 1999). Este modelo deve ser verificado periodicamente, para avaliar a flutuação que pode ser inerente ao equipamento. O uso rotineiro de

um modelo também pode requerer a inclusão de novas amostras de referência, assim como a verificação da otimização para garantir a robustez deste modelo (PASQUINI, 2003).

3.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Procedimento analítico é uma descrição detalhada da forma como uma análise deve ser realizada. Deve conter o passo-a-passo do método de análise, assim como informações pertinentes, como o tipo de amostra, os padrões de referência e reagentes utilizados, assim como seu preparo, equipamentos e seu uso, curvas de calibração e similares, cálculos e fórmulas envolvidos para a expressão do resultado final, além do cuidado necessário para que o resultado seja confiável (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005).

Dessa forma, após o desenvolvimento de um procedimento analítico, a validação consiste na averiguação da garantia de uma performance adequada para as condições de trabalho, ou seja, se o método atende ao seu propósito (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

Alguns dos tipos mais comuns de procedimentos analíticos que devem ser validados são os testes de identificação de substâncias, os testes qualitativos e quantitativos para o controle de impurezas e os testes quantitativos de princípios ativos em matérias-primas ou produtos acabados (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005).

Uma descrição rápida dos tipos mais comuns de testes pode ser dada como (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005):

- ✓ testes de identificação: são aqueles onde se busca identificar um analito, numa amostra, através da comprovação de alguma característica deste, por comparação com um padrão ou substância de referência;

- ✓ testes qualitativos ou quantitativos de impurezas: buscam demonstrar a pureza de uma amostra, logo, sua intenção é demonstrar que não há outras substâncias presentes, ou se há, que estas estão em quantidades insuficientes para causar risco ao produto final;
- ✓ testes de quantificação de princípio ativo: são procedimentos analíticos, com o objetivo de representar uma medida quantitativa do componente majoritário, quando uma matéria-prima é analisada, ou uma medida quantitativa do princípio ativo, em produtos acabados.

Quando realizada por indústrias ou laboratórios, a validação deve estar descrita em um procedimento, tendo também todos os dados obtidos durante a validação, devidamente registrados (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010). Os objetivos do processo de validação devem estar claramente definidos neste procedimento, onde também devem constar quais os parâmetros a serem avaliados na validação (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005).

Os parâmetros pelos quais a validação de um processo analítico pode ser atestada são chamados figuras de mérito (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Dentre as figuras de mérito mais comuns a serem consideradas para uma validação, podemos citar (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010):

- ✓ exatidão (ou recuperação);
- ✓ precisão, sendo avaliada de três formas: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade;
- ✓ seletividade e especificidade;
- ✓ limite de detecção;
- ✓ limite de quantificação;
- ✓ linearidade;
- ✓ intervalo (ou faixa de trabalho);
- ✓ robustez.

A validação deve atender critérios rígidos e levar em consideração todo o contexto, incluindo o uso de equipamentos e vidrarias calibrados, assim como o uso de materiais de referência confiáveis (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

Outro ponto importante a ser discutido é a revalidação, que deve ser realizada quando houver alterações (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005):

- ✓ na síntese do princípio ativo ou dos excipientes;
- ✓ na composição do produto acabado;
- ✓ no procedimento analítico.

Resumindo, a validação analítica tem como objetivo demonstrar que um método é apropriado para a finalidade pretendida. No caso de determinação de metodologia analítica para controle de qualidade, mais especificamente na questão de determinação de concentrações, tem o objetivo de garantir que a análise quantitativa do fármaco, quando realizada através de ensaios experimentais, permita chegar a resultados confiáveis (BRASIL, 2003).

O *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use - ICH* (2005), tem um procedimento para validação de metodologias analíticas, aceito internacionalmente. O FDA (2010) usa este mesmo procedimento. O Labcompliance é uma organização privada que traz informações sobre qualidade, auxiliando na implementação das regulamentações fornecidas pelo FDA e ISO (LABCOMPLIANCE, 2010).

No Brasil, o INMETRO (2010) tem um documento orientativo para a validação de procedimentos analíticos, o DOQ-CGCRE-008 – Orientação sobre validação de métodos analíticos, que contém informações bastante claras sobre o assunto. Esse documento é baseado em normas internacionais, como as descritas pelo ICH.

Já a legislação brasileira que determina quais figuras de mérito devem ser analisadas e em quais categorias de produtos, é a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, sendo esta o “Guia para validação de métodos analíticos e bionalíticos”. Essa resolução se assemelha bastante ao descrito pelo ICH e os testes necessários à validação descritos nessa legislação podem ser classificados

em quatro categorias conforme sua finalidade, de acordo com o exposto na **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

TABELA 3 - Classificação dos testes de validação, segundo sua finalidade

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

FONTE: BRASIL, 2003.

Ainda, cada categoria de testes exige uma série de ensaios, conforme a **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

TABELA 4 - Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

FONTE: BRASIL, 2003.

3.5.1 Seletividade e especificidade

Tanto o ICH (2005) como a ANVISA (2003), utilizam o termo especificidade. Entretanto, para a química analítica, este não é o melhor termo, conforme discutido por Vessman (1996). Para esse autor, em química analítica, o termo especificidade define uma característica absoluta do método, enquanto a seletividade demonstra algo que pode ser medido (VESSMAN, 1996). Portanto, adotaremos aqui o termo seletividade, empregado pelo INMETRO (2010).

Para os métodos univariados, a seletividade é a capacidade que um método possui de determinar exatamente um composto presente na amostra, de forma isolada, na presença de outras substâncias, tais como excipientes, impurezas e produtos de degradação (BRASIL, 2003). Portanto, essa figura de mérito deve ser avaliada para evitar a interferência de substâncias externas nos processos de medição, como aumentar ou diminuir a intensidade do sinal analítico do analito de interesse (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

Nos métodos que utilizam calibração univariada, os procedimentos a serem usados na avaliação da seletividade vão depender dos objetivos do procedimento analítico. Para essa avaliação, podem ser utilizados padrões ou materiais de referência, amostras que contenham ou não o analito de interesse, ou a identificação do analito de interesse frente à presença de interferentes. Se for necessário, dois ou mais procedimentos podem ser utilizados para demonstrar a seletividade de um método. Uma vez que a linearidade, a exatidão e a precisão podem ser comprometidas se esse parâmetro não estiver bem definido, a seletividade deve ser o primeiro parâmetro a ser levado em conta na validação (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

Para modelos multivariados de calibração, a seletividade pode ser estimada a partir do cálculo do Sinal Analítico Líquido (NAS - *Net Analyte Signal*). O NAS é definido como a fração do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos demais compostos presentes na amostra (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009) e sua representação geométrica pode ser observada na FIGURA 9.

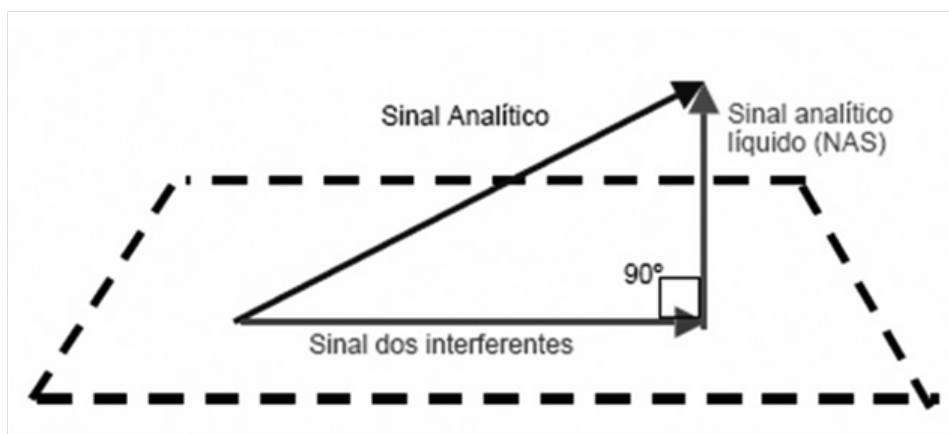


FIGURA 9 - Representação geométrica da propriedade de ortogonalidade do Sinal Analítico Líquido - NAS (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

Nesses modelos, a seletividade é uma medida do grau de sobreposição entre o sinal do analito (espécie em estudo) e os interferentes presentes na amostra (como os excipientes, por exemplo), indicando ainda a parte do sinal que é perdida quando ocorre esta sobreposição. Matematicamente, a seletividade é definida como:

$$\text{SELETIVIDADE} = \frac{\hat{n}a_{s_i}}{\|x_i\|}$$

que é a razão do vetor escalar NAS ($\hat{n}a_{s_i}$) e da norma Euclidiana do vetor original da resposta instrumental ($\|x_i\|$) (LORBER; FABER; KOWALSKI, 1997) e demonstra quanto do sinal espectroscópico é utilizado pelo modelo para a quantificação dos fármacos (VALDERRAMA, 2005). Portanto, o que se tem é que, o resultado obtido não se refere ao sentido geralmente empregado para a seletividade para modelos univariados, mas uma forma de estimar quanto do sinal espectroscópico é perdido por ortogonalidade (VALDERRAMA, 2005).

3.5.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade que o método possui de demonstrar que os resultados experimentais obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, respeitando um intervalo especificado (BRASIL, 2003). Esse parâmetro assegura que a resposta medida pelo equipamento seja representativa da concentração do analito em pesquisa. Para tal, é necessário que se conheça a

dependência entre a resposta medida e a concentração do analito (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

A linearidade pode ser avaliada juntamente com o estudo do intervalo e pode ser medida com o uso de soluções padrão de referência diluídas ou por diferentes pesagens dos componentes do produto acabado em análise (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005).

A avaliação da linearidade pode ser realizada de forma visual, através de uma curva, onde estão plotados os dados de concentração do analito e as respostas dos ensaios analíticos. Quando essa representação é linear, há a necessidade de tratar os resultados dos ensaios de forma estatística, para obtenção de dados tais, como o coeficiente de correlação, a inserção com o eixo Y, o coeficiente angular, a soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e o desvio padrão relativo (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

Quando a relação entre a concentração e os resultados medidos não for linear, algumas transformações prévias à regressão linear podem ser requeridas para se chegar aos resultados desejados (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005).

Em alguns casos, dependendo do tipo de procedimento analítico utilizado, como por exemplo imunoensaios, mesmo após as transformações matemáticas, não se consegue uma correlação linear. Nesses casos, deve haver uma função que modele a concentração do analito na amostra, para representar a resposta analítica (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

Uma vez que este parâmetro correlaciona a resposta medida e a concentração do analito na amostra, pode ser expresso através da equação da reta

$$y = a + bx$$

onde y = resposta medida (podendo ser absorvância, altura ou área do pico, entre outros); a = interseção com o eixo y , quando $x = 0$; b = inclinação da curva analítica (ou seja, a sensibilidade); e x = concentração (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

Para obtenção dessa equação da reta, também conhecida como curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004), são recomendadas a verificação de, no mínimo, cinco concentrações (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010), que devem atender aos intervalos estabelecidos, conforme descrito na **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

TABELA 5 - Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor.

FONTE: BRASIL, 2003.

Ainda segundo as orientações do INMETRO (2010), o número de replicatas de cada nível de concentração deve ser similar àquele utilizado na rotina do laboratório.

O método pode ser dito mais sensível quando pequenas variações da concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, quando há maior inclinação da reta (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

O coeficiente de correlação (r^2) é um dos valores medidos para avaliar a qualidade da curva obtida: quanto mais próximo esse valor for de 1,0, podemos dizer que menor é a dispersão dos pontos obtidos experimentalmente e menor será a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004). Segundo Ribani e colaboradores (2004), um coeficiente de correlação maior que 0,999 demonstra um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. Para a ANVISA (2003), o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r^2) é de 0,99.

Nos modelos univariados, a linearidade pode ser avaliada num gráfico que correlaciona a concentração com a medida instrumental (FERREIRA; GOMES; SENA, 2009). Entretanto, nas técnicas multivariadas, em especial naquelas que utilizam PLS ou PCR, esse cálculo é problemático, devido à decomposição das variáveis pelas componentes principais (BRAGA; POPPI, 2004; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

Devido à dificuldade em se estimar a linearidade, uma figura de mérito chamada *ajuste* tem sido bastante utilizada para se ter uma idéia da linearidade de um modelo multivariado. Esse parâmetro utiliza a correlação entre os valores tidos como referência e os valores previstos pelo modelo para a obtenção do coeficiente de correlação e desta forma, uma avaliação da linearidade pode ser conseguida (FERREIRA; GOMES; SENA, 2009; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

3.5.3 Intervalo

Intervalo é a faixa entre a maior e a menor concentração, incluindo estas, onde se pode quantificar um analito em uma amostra, com exatidão, precisão e linearidade adequados (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005), ou seja, o limite de quantificação onde é possível conseguir resultados com confiabilidade.

Segundo Ribani e colaboradores (2004), somente dentro do intervalo, ou faixa de trabalho, é que a curva analítica apresenta resultados confiáveis.

A faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser utilizado deve estar coberta pelo intervalo. É indicado que a concentração mais esperada da amostra esteja,

sempre que possível, no centro do intervalo (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

Os valores aceitos para o intervalo, segundo a Resolução RE nº 899 (BRASIL, 2003), são descrito na **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

3.5.4 Precisão

A precisão mede quanto os resultados obtidos de uma mesma amostra, em uma série de medidas, sobre as mesmas condições de análise, se aproximam entre si. Pode ser avaliada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRASIL, 2003).

A precisão é geralmente expressa através do coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), comumente expressos em percentual, de uma série de medidas. O desvio padrão relativo pode ser calculado pela seguinte equação

$$CV = DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

onde DP = desvio padrão; CMD = concentração média determinada (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

O valor aceitável deve ser definido levando-se em consideração a metodologia empregada, a concentração do analito da amostra, o tipo de matriz empregada e a finalidade do método (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010). A ANVISA (2003) recomenda que essa variação não deve ser superior a 5%.

3.5.4.1 Repetitividade

O termo repetitividade é utilizado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia (RIBANI *et al.*, 2004) sendo, portanto, o termo padronizado pelo INMETRO (2010). Já a ANVISA (2003) utiliza o termo repetibilidade para esse parâmetro.

A repetitividade ou precisão intracorrida, avalia a concordância de resultados em um curto período de tempo, com os ensaios sendo realizados por um mesmo analista, utilizando o mesmo procedimento de análise, com o mesmo equipamento sendo utilizado sob as mesmas condições e, preferencialmente, num mesmo local (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010), ou seja, avalia as mesmas condições de análise em um curto período de tempo (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005).

Para a repetitividade, é recomendada a realização de, no mínimo, seis determinações da concentração aceita como nominal, ou seja, 100% da concentração da amostra ou de, no mínimo, nove determinações, que cubram o intervalo especificado, ou seja, três determinação de um amostra com concentração de 100%, três determinações de uma amostra com concentração menor do que 100% e três determinações de uma amostra com concentração maior que 100% (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

3.5.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária, também chamada de precisão intercorridas, avalia as diferenças que podem ocorrer numa mesma amostra, utilizando o mesmo método de análise, dentro do mesmo laboratório, com uma ou mais das seguintes variações:

diferentes dias de análise (tempo), diferentes analistas e equipamentos diferentes (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

Portanto, podemos afirmar que a precisão intermediária representa a variabilidade dos dados obtidos em um mesmo laboratório (RIBANI *et al.*, 2004; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010). Seu objetivo é verificar se o método analítico em questão fornece os mesmos resultados dentro de um laboratório (RIBANI *et al.*, 2004).

A ANVISA (2003) recomenda um mínimo de dois dias, com dois diferentes analistas para a determinação da precisão intermediária.

3.5.4.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade, ou precisão interlaboratorial, como o nome já diz, avalia a concordância entre resultados obtidos em diferentes laboratórios (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005). Exemplos disso são os estudos colaborativos, geralmente aplicados quando se faz padronização de metodologias analíticas, por exemplo, para a inclusão destas em farmacopéias ou aqueles estudos requeridos para a acreditação de laboratórios de ensaio, conforme a norma ISO/IEC 17025, por exemplo (BRASIL, 2003; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

Estes dados não precisam estar necessariamente inclusos num procedimento de validação interno (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005).

3.5.5 Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente na amostra, que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, sob condições analíticas determinadas (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

É estabelecido através da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível que se consiga detectar (BRASIL, 2003).

Como, para um mesmo procedimento analítico, o limite de detecção pode variar em função do tipo de amostra, é fundamental que todas as etapas de processamento do método analítico estejam incluídas na determinação deste parâmetro (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

O limite de detecção pode ser avaliado de diferentes formas, dependendo do método analítico utilizado (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010). Alguns dos métodos mais frequentes são os baseados na avaliação visual dos instrumentos gráficos obtidos, como espectros, por exemplo, os baseados na relação sinal-ruído, conseguidos somente para procedimentos que mostrem o sinal ruído da linha de base e através de cálculos matemáticos, e os baseados em parâmetros da curva analítica, obtidos também através de cálculos matemáticos (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

3.5.6 Limite de quantificação

É a menor concentração do analito que pode ser quantitativamente determinada numa amostra, com precisão e exatidão, sob condições experimentais definidas (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005).

Por ser um parâmetro importante para ensaios quantitativos onde há pequenas concentrações do analito na matriz, esse parâmetro é particularmente utilizado para a determinação de impurezas e para produtos de degradação (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005).

Como se trata de uma relação entre concentração e sua precisão e exatidão, deve ser observado o fato de que quando o nível de concentração do limite de quantificação decresce, sua medida se torna menos precisa. Dessa forma, se uma maior precisão for requerida, uma maior concentração do analito como limite de quantificação deve ser levada em consideração (RIBANI *et al.*, 2004).

Pode ser avaliado da mesma forma que o limite de detecção: pelo método visual, pelo método baseado na relação sinal-ruído e pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

3.5.7 Exatidão

A exatidão demonstra o quanto um método analítico permite que os resultados encontrados estejam próximos dos resultados aceitos como valores reais convencionais ou valores de referência (BRASIL, 2003).

Deve ser avaliada dentro do intervalo determinado para o procedimento analítico (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005).

Várias são as metodologias disponíveis para a validação deste parâmetro (BRASIL, 2003). No caso de formas farmacêuticas, a análise mais recomendada é aquela na qual quantidade conhecida de fármaco tenha sido adicionada a uma mistura de componentes do medicamento, ou seja, um placebo contaminado. No caso da impossibilidade de se ter todos os componentes do medicamento, é aceita a análise através da adição de quantidade conhecida do analito (um padrão de referência deste) ao medicamento (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005).

A exatidão deve ser estabelecida após a determinação da linearidade, do intervalo e da seletividade do método, sendo verificada pela determinação de, pelo menos, nove amostras, que contemplem o intervalo determinado, sendo uma concentração abaixo da concentração nominal, uma concentração na média do valor nominal e uma concentração acima do valor nominal, com triplicata de cada ponto avaliado (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005).

A exatidão é calculada como percentual de recuperação da quantidade conhecida do fármaco adicionado à amostra ou como diferença percentual entre as médias de recuperação e o valor verdadeiro aceito (valor teórico), acrescida do intervalo de confiança. Deve ser expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, através da seguinte fórmula (BRASIL, 2003):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

3.5.8 Robustez

A robustez de um método analítico mede a capacidade deste método em resistir a deliberadas e pequenas variações nos parâmetros analíticos, indicando sua confiabilidade no uso corriqueiro. O objetivo de avaliar este parâmetro é controlar e prevenir variações que possam interferir no resultado final (BRASIL, 2003).

Esses parâmetros analíticos devem ser avaliados durante a fase de desenvolvimento da metodologia e dependem do tipo de metodologia em estudo. Essas variações, se constatadas, devem ser inseridas em procedimentos operacionais padrão e devidamente alertadas aos analistas que realizem o ensaio (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005).

Alguns fatores que podem ser avaliados na robustez estão descritos na TABELA 6.

TABELA 6 - Alguns fatores que podem ser avaliados para o teste de robustez

Preparo das Amostras	- estabilidade das soluções analíticas - tempo de extração
Espectrofotometria	- variação do pH da solução - temperatura - diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	- variação do pH da fase móvel - variação na composição da fase móvel - diferentes lotes ou fabricantes de colunas - temperatura - fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	- diferentes lotes ou fabricantes de colunas - temperatura - velocidade do gás de arraste

FONTE: BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005.

Quando, durante o processo de desenvolvimento e validação de um procedimento analítico, houver mudanças de fornecedores, marcas de reagentes ou equipamentos, sem alterações significativas dos resultados, pode-se dizer que o método possui uma robustez intrínseca, pois a resposta foi mantida, mesmo perante essas pequenas alterações (RIBANI *et al.*, 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

As formas farmacêuticas utilizadas no desenvolvimento da metodologia foram cápsulas do medicamento com nome comercial LOTAR®, uma associação de anlodipino (na sua forma besilato) e losartano potássico, nas apresentações 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico e 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico. As cápsulas foram fabricadas pela empresa Biossintética Farmacêutica LTDA (Grupo Aché). Para a conversão da concentração de anlodipino para besilato de anlodipino utilizou-se a seguinte relação: cada 2,5 mg de anlodipino correspondem a 3,472 mg de besilato de anlodipino.

Os padrões de losartano potássico e besilato de anlodipino utilizados neste desenvolvimento foram doados por uma indústria farmacêutica, sendo padrões secundários, validados de padrões USP, com fator de pureza de 99,9 e 100,2%, respectivamente.

Os excipientes, grau farmacêutico, utilizados foram: lactose, amido, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, silicato de magnésio, dióxido de titânio e polietilenoglicol.

Outros reagentes utilizados foram: brometo de potássio P.A., metanol P.A., etanol P.A. e acetonitrila P.A.

Também foram utilizados fosfato de sódio monobásico mono-hidratado P.A. e ácido fosfórico P.A. 88%, para o preparo do tampão e ajuste do pH.

Água ultrapura foi utilizada em todas as etapas de preparação.

Além desses, para o doseamento e recuperações por CLAE, foram utilizados reagentes diversos, grau CLAE, como metanol e acetonitrila.

Todas as vidrarias utilizadas se encontravam calibradas.

As filtrações para espectroscopia na região do ultravioleta foram realizadas em papel filtro quantitativo, faixa azul, J Prolab JP42, com 15 cm de diâmetro e maioria dos poros com 8 µm. As filtrações para CLAE foram realizadas em membrana de éster de celulose 0,45 µm com 47 mm de diâmetro e membrana PVDF 0,45 µm com 33 mm de diâmetro (Millex®), ambos adquiridos da Millipore.

As pipetagens foram realizadas com pipetas volumétricas ou micropipetas calibradas.

Os tampões padrões utilizados para calibração do pHmetro foram Certipur pH 4,01, 7,01 e 10,01 (MERCK).

A coluna analítica utilizada nas análises por CLAE foi Waters XBridge™ C18, diâmetro das partículas de 5 µm, dimensão da coluna de 4,6 x 150 mm, e pré-coluna Waters, C18, diâmetro das partículas de 5 µm, dimensão da coluna de 4,6 x 20 mm.

Os equipamentos utilizados foram ultrapurificador de água Milli-Q A10 Gradiente; banho de ultrassom Branson 2510; agitador mecânico Glas-Col Large Capacity Mixer; balança analítica Mettler Toledo XP 205; balança analítica Mettler Toledo AB 204-S/FACT; medidor de pH de bancada digital HI8519N Hanna; espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1800; espectrômetro de infravermelho com acessório de reflectância difusa Bruker VERTEX 70; cromatógrafo Agilent 1100 Series, equipado com detector DAD; software Origin 8.0; aplicativo PLS-toolbox que opera em ambiente Matlab 7.0.1; software UV-Probe 2.33 (espectrofotômetro UV-VIS); software OPUS 6.5 (espectrômetro de infravermelho) ; software ChemStation® versão A.10.02 (cromatógrafo).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo das soluções padrões e amostras

Inicialmente, foi realizado um estudo para a escolha do melhor solvente a ser empregado no preparo das soluções padrões e amostras (item 4.2.4.1, p. 78). A partir da definição dos solventes, será descrita a preparação das soluções utilizadas para a montagem dos modelos de calibração multivariada.

4.2.1.1 Soluções empregadas para a apresentação 2,5 mg + 50 mg

4.2.1.1.1 Soluções padrão de losartano potássico

a) *Solução padrão LP-A*

Pesou-se, exatamente, cerca de 25 mg do padrão de losartano potássico e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

Concentração final: 500 µg/mL.

b) *Solução padrão LP-B*

Transferiu-se 20,0 mL da *solução padrão LP-A* para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

Concentração final: 100 µg/mL.

c) *Solução padrão LP-C*

Transferiu-se 5,0 mL da *solução padrão LP-A* para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

Concentração final: 50 µg/mL.

4.2.1.1.2 Soluções padrão de besilato de anlodipino

a) *Solução padrão BA-A1*

Pesou-se, exatamente, cerca de 54,25 mg do padrão de besilato de anlodipino e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

Concentração final: 2170 µg/mL.

b) *Solução padrão BA-A2*

Transferiu-se 2,0 mL da *solução padrão BA-A1* para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

Concentração final: 173,6 µg/mL.

c) *Solução padrão BA-B*

Transferiu-se 4,0 mL da *solução padrão BA-A2* para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

Concentração final: 6,944 µg/mL.

d) *Solução padrão BA-C*

Transferiu-se 1,0 mL da *solução padrão BA-A2* para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

Concentração final: 3,472 µg/mL.

4.2.1.1.3 Soluções amostra

a) *Solução amostra A*

Inicialmente, determinou-se o peso médio do conteúdo das cápsulas, a partir de dez cápsulas. Triturou-se o conteúdo das cápsulas e foram pesados exatamente o equivalente a dois pesos médios. Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e adicionou-se cerca de 30 mL da mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v). Deixou-se em agitação mecânica por 30 minutos. Após esse tempo, adicionou-se mais 30 mL de solvente ao balão, que foi mantido em banho de ultrassom por mais 30 minutos. Completou-se o volume do balão com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v) e filtrou-se a solução, utilizando papel filtro quantitativo e desprezando os primeiros mililitros do filtrado.

Concentração final: 1000 µg/mL de losartano potássico e 55,56 µg/mL de besilato de anlodipino.

b) *Solução amostra B*

Transferiu-se 50,0 mL da *solução amostra A* para balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

Concentração final: 200 µg/mL de losartano potássico e 11,112 µg/mL de besilato de anlodipino.

c) *Soluções amostra C1 a C25*

As *soluções amostra C* são compostas pelo conjunto das 25 amostras utilizadas para a montagem dos modelos multivariados, sendo que cada amostra corresponde a um número (C1, C2, ...).

Para o preparo dessas soluções, transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, quantidades da *solução amostra B* e das *soluções padrão LP-B, LP-C, BA-B* e *BA-C*, conforme o disposto no QUADRO 1. Completou-se o volume com água.

4.2.1.1.4 Solução de validação

a) *Solução de validação A*

Preparou-se uma solução conforme o descrito para *solução amostra A*. Dessa solução, transferiu-se 1,0 mL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com água.

Concentração final: 40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino.

Amostra	Solução amostra B (mL)	Solução padrão LP-C (mL)	Solução padrão LP-B (mL)	Solução padrão BA-C (mL)	Solução padrão BA-B (mL)	Concentração final de leitura (µg/mL)*		% absoluto em relação aos valores descritos no rótulo	
						Losartano potássico	Besilato de anlodipino	Losartano potássico	Besilato de anlodipino
C1	4,0		2,0		2,0	40,0	2,778	0	0
C2	4,0	4,0		2,0		40,0	2,500	0	- 10
C3	4,0	4,0				40,0	2,222	0	- 20
C4	4,0	5,0		3,0		42,0	2,639	5	- 5
C5	4,0		3,0	2,0		44,0	2,500	10	- 10
C6	4,0	1,0	3,0	1,0		46,0	2,361	15	- 15
C7	4,0		4,0			48,0	2,222	20	- 20
C8	4,0		3,0		2,0	44,0	2,778	10	0
C9	4,0		4,0		2,0	48,0	2,778	20	0
C10	4,0	1,0	2,0	1,0	2,0	42,0	2,916	5	5
C11	4,0		3,0		3,0	44,0	3,055	10	10
C12	4,0	3,0	2,0	3,0	2,0	46,0	3,194	15	15
C13	4,0		4,0		4,0	48,0	3,333	20	20
C14	4,0		2,0		3,0	40,0	3,055	0	10
C15	4,0		2,0		4,0	40,0	3,333	0	20
C16	4,0	3,0		5,0		38,0	2,916	- 5	5
C17	4,0	2,0			3,0	36,0	3,055	- 10	10
C18	4,0	1,0		1,0	3,0	34,0	3,194	- 15	15
C19	4,0				4,0	32,0	3,333	- 20	20
C20	4,0	2,0		4,0		36,0	2,778	- 10	0
C21	4,0			4,0		32,0	2,778	- 20	0
C22	4,0	3,0		3,0		38,0	2,639	- 5	- 5
C23	4,0	2,0		2,0		36,0	2,500	- 10	- 10
C24	4,0	1,0		1,0		34,0	2,361	- 15	- 15
C25	4,0					32,0	2,222	- 20	- 20

Concentrações da *solução amostra B*: LP = 200,0 µg/mL; BA = 6,944 µg/mL

Concentrações das *soluções padrão LP-B*: LP = 100,0 µg/mL; *solução LP-C*: 50,0 µg/mL; *solução BA-B*: 6,944 µg/mL e *solução BA-C*: 3,472 µg/mL.

*Volume final: 25 mL

QUADRO 1 - Preparo das soluções amostra C dos modelos multivariados, concentrações finais de leitura e percentual absoluto em relação ao valor original, para apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.

4.2.1.2 Soluções empregadas para a apresentação 5 mg + 50 mg

4.2.1.2.1 Soluções padrão de losartano potássico

Para essa apresentação, não há alteração na massa de losartano potássico (50 mg/cápsula). Portanto, as *soluções padrão* de losartano potássico foram as mesmas do item 4.2.1.1.1.

4.2.1.2.2 Soluções padrão de besilato de anlodipino

a) *Solução padrão BA-D1*

Pesou-se, exatamente, cerca de 54,25 mg do padrão de besilato de anlodipino e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

Concentração final: 2170 µg/mL.

b) *Solução padrão BA-D2*

Transferiu-se 4,0 mL da *solução padrão BA-D1* para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

Concentração final: 347,2 µg/mL.

c) *Solução padrão BA-E*

Transferiu-se 4,0 mL da *solução padrão BA-D2* para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

Concentração final: 13,888 µg/mL.

d) *Solução padrão BA-F*

Transferiu-se 1,0 mL da *solução padrão BA-D2* para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

Concentração final: 6,944 µg/mL.

4.2.1.2.3 Soluções amostra

a) *Solução amostra D*

Preparou-se conforme o descrito no item 4.2.1.1.3, a) *Solução amostra A*.

Concentração final: 1000 µg/mL de losartano potássico e 138,88 µg/mL de besilato de anlodipino.

b) *Solução amostra E*

Transferiu-se 50,0 mL da *solução amostra D* para balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

Concentração final: 200 µg/mL de losartano potássico e 27,78 µg/mL de besilato de anlodipino.

c) *Soluções amostra F1 a F25*

As *soluções amostra F* foram compostas pelo conjunto das 25 amostras utilizadas para a montagem dos modelos multivariados, sendo que cada amostra corresponde a um número (*F1, F2, ...*).

Para o preparo dessas soluções, transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL quantidades da *solução amostra E* e das *soluções padrão LP-B, LP-C, BA-E* e *BA-F*, conforme o disposto no QUADRO 2. Completou-se o volume com água.

4.2.1.2.4 Solução de validação

a) *Solução de validação D*

Preparou-se uma solução conforme o descrito para *solução amostra D*. Dessa solução, transferiu-se 1,0 mL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com água.

Concentração final: 40 µg/mL de losartano potássico e 5,556 µg/mL de besilato de anlodipino.

Amostra	Solução amostra E (mL)	Solução padrão LP-C (mL)	Solução padrão LP-B (mL)	Solução padrão BA-F (mL)	Solução padrão BA-E (mL)	Concentração final de leitura (µg/mL)		% absoluto em relação aos valores descritos no rótulo	
						Losartano potássico	Besilato de anlodipino	Losartano potássico	Besilato de anlodipino
F1	4,0		2,0		2,0	40,0	5,556	0	0
F2	4,0	4,0		2,0		40,0	5,000	0	- 10
F3	4,0	4,0				40,0	4,444	0	- 20
F4	4,0	5,0		3,0		42,0	5,277	5	- 5
F5	4,0		3,0	2,0		44,0	5,000	10	- 10
F6	4,0	1,0	3,0	1,0		46,0	4,722	15	- 15
F7	4,0		4,0			48,0	4,444	20	- 20
F8	4,0		3,0		2,0	44,0	5,556	10	0
F9	4,0		4,0		2,0	48,0	5,556	20	0
F10	4,0	1,0	2,0	1,0	2,0	42,0	5,833	5	5
F11	4,0		3,0		3,0	44,0	6,111	10	10
F12	4,0	3,0	2,0	3,0	2,0	46,0	6,388	15	15
F13	4,0		4,0		4,0	48,0	6,666	20	20
F14	4,0		2,0		3,0	40,0	6,111	0	10
F15	4,0		2,0		4,0	40,0	6,666	0	20
F16	4,0	3,0		5,0		38,0	5,833	- 5	5
F17	4,0	2,0			3,0	36,0	6,111	- 10	10
F18	4,0	1,0		1,0	3,0	34,0	6,388	- 15	15
F19	4,0				4,0	32,0	6,666	- 20	20
F20	4,0	2,0		4,0		36,0	5,556	- 10	0
F21	4,0			4,0		32,0	5,556	- 20	0
F22	4,0	3,0		3,0		38,0	5,277	- 5	- 5
F23	4,0	2,0		2,0		36,0	5,000	- 10	- 10
F24	4,0	1,0		1,0		34,0	4,722	- 15	- 15
F25	4,0					32,0	4,444	- 20	- 20

Concentrações da *solução amostra B*: LP = 200,0 µg/mL; BA = 13,888 µg/mL

Concentrações das *soluções padrão LP-B*: LP = 100,0 µg/mL; *solução LP-C*: 50,0 µg/mL; *solução BA-E*: 13,888 µg/mL e *solução BA-F*: 6,944 µg/mL.

*Volume final: 25 mL

QUADRO 2 - Preparo das soluções amostra C dos modelos multivariados, concentrações finais de leitura e percentual absoluto em relação ao valor original, para apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.

4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Como foi utilizado o próprio medicamento para a montagem dos modelos, foi necessário verificar a dosagem indicada no rótulo do medicamento, por método validado, sendo escolhido o método por CLAE, conforme Pedroso e colaboradores (2009).

Durante a realização dos testes para montagem de modelos de calibração multivariada, também foram realizadas algumas análises por CLAE, conforme Pedroso e colaboradores (2009), para a quantificação dos fármacos no medicamento. Os resultados obtidos nessas quantificações foram utilizados para a correção dos valores de concentração utilizados na montagem dos conjuntos de calibração/validação dos modelos de calibração multivariada. A solução da amostra utilizada no doseamento por CLAE foi sempre a mesma utilizada para a montagem dos modelos de calibração.

Para o preparo das soluções, tanto as amostras quanto os padrões, foi utilizada uma mistura composta por acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

Para o doseamento da apresentação comercial 2,5 mg de anlodipino e 50 mg de losartano potássico, preparou-se as soluções de injeção amostra e padrão da seguinte maneira:

Solução amostra C1-CLAE: foram transferidos 2,0 mL da *solução amostra B* para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v). Concentração final: 40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino.

Solução padrão C-CLAE: foram transferidos 4,0 mL de cada uma das soluções padrão *LP-B* e *BA-B* para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v). Concentração final: 40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino.

Para a apresentação comercial 5 mg de anlodipino e 50 mg de losartano potássico, preparou-se as seguintes soluções de injeção amostra e padrão:

Solução amostra F1-CLAE: foram transferidos 2,0 mL da *solução amostra E* para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com a mistura

acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v). Concentração final: 40 µg/mL de losartano potássico e 5,556 µg/mL de besilato de anlodipino.

Solução padrão F-CLAE: foram transferidos 4,0 mL de cada uma das soluções padrão *LP-B* e *BA-E* para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v). Concentração final: 40 µg/mL de losartano potássico e 5,556 µg/mL de besilato de anlodipino.

As condições cromatográficas utilizadas para a análise em CLAE foram as mesmas definidas por Pedroso e colaboradores (2009), conforme seguem:

- ✓ Coluna: Waters XBridge C18, comprimento de 150 mm, diâmetro de 4,6 mm, diâmetro das partículas de 5 µm;
- ✓ Fase móvel: acetonitrila e tampão fosfato 10 mmol/L pH 3,0 – gradiente;
- ✓ Fluxo: 1 mL/min;
- ✓ Temperatura do forno: ambiente;
- ✓ Volume de injeção: 20 µL.

O gradiente seguiu as condições da TABELA 7.

TABELA 7 - Gradiente utilizado nas análises por CLAE

Tempo (min)	% Tampão fosfato 10 mmol/L pH 3,0	% acetonitrila	Eluição
0	65	35	
0 – 10	65-35	35-65	Gradiente Linear
10 – 15	35-65	65-35	Gradiente Linear
15 – 20	65	35	Reequilíbrio

FONTE: PEDROSO *et al.*, 2009.

Para o doseamento inicial, três amostras diferentes foram preparadas, analisadas e quantificadas. Três amostras diferentes dos padrões também foram preparadas para análise. Os valores de quantificação apresentados são referentes à média aritmética desses três resultados.

Como o método de doseamento foi desenvolvido por este grupo, utilizando os mesmos equipamentos, nenhum teste de adequabilidade foi realizado.

Para as análises de quantificação na etapa de escolha do solvente, as *soluções padrões LP-A, LP-B, BA-A1, BA-A2, BA-B, BA-D1, BA-D2, BA-E* e as *soluções amostra B e E* foram preparadas com o mesmo solvente de estudo, sendo

somente a amostra injetada no cromatógrafo diluída na mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

4.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho - reflectância difusa

Inicialmente foi proposta a montagem de um modelo utilizando a espectroscopia na região do infravermelho, com reflectância difusa, por ser este um método com menor geração de resíduos finais, uma vez que seria necessário apenas triturar o medicamento, diluí-lo em brometo de potássio e colocá-lo no compartimento de leitura do espectrofotômetro.

As análises preliminares no espectrofotômetro na região do infravermelho, são referentes à apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.

Para essa análise, o conteúdo das cápsulas do medicamento foi triturado, seco em dessecador com sílica sob vácuo e diluído com brometo de potássio para atingir a proporção de 1:3. Essa diluição foi necessária para atingir intensidade de sinal apropriada. Os padrões dos fármacos foram também diluídos em brometo de potássio, para atingir a mesma concentração da amostra contendo o medicamento.

As amostras preparadas foram: uma amostra contendo somente a associação de anti-hipertensivos (medicamento comercial), uma amostra contendo somente o padrão de besilato de anlodipino, uma amostra contendo somente o padrão de losartano potássico, uma amostra contendo a mistura dos dois padrões dos fármacos, visando obter espectros da amostra e dos fármacos para comparação; e outras cinco amostras, contendo além do medicamento triturado, um dos dois padrões ou os dois padrões, visando obter espectros de amostras com diferentes concentrações dos fármacos.

Os espectros das amostras foram registrados em espectrômetro na região do infravermelho, com acessório de reflectância difusa, nas seguintes faixas espectrais: de 7000 a 4000 cm^{-1} (fonte do IV próximo) e de 4000 a 400 cm^{-1} (fonte do IV médio) utilizando-se 128 aquisições.

4.2.4 Espectroscopia na região do ultravioleta

Para a montagem dos modelos de calibração multivariada, conjuntos de 25 amostras foram preparados, conforme o descrito nos itens 4.2.1.1.3, c) *Soluções amostra C1 a C25* e 4.2.1.2.3, c) *Soluções amostra F1 a F25*.

As amostras diluídas compreenderam concentrações que variaram, a partir da concentração nominal (40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 ou 5,556 µg/mL de besilato de anlodipino, dependendo da apresentação utilizada), em até 20% para mais e para menos, da concentração dos dois fármacos presentes na associação, conforme o disposto no QUADRO 1 (p. 69) e no QUADRO 2 (p. 73). As variações das concentrações das soluções preparadas estão representadas na FIGURA 10 e na FIGURA 11.

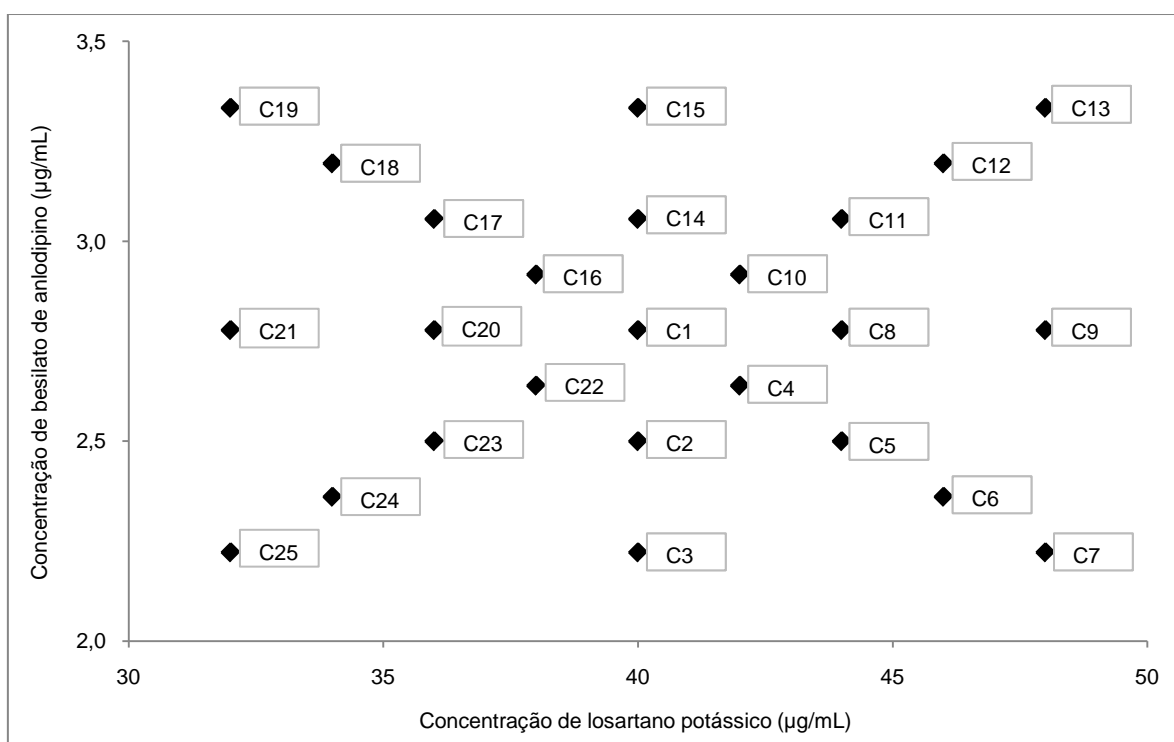


FIGURA 10 - Conjunto de amostras utilizadas na montagem dos modelos multivariados, apresentando a variação das concentrações dos fármacos para a apresentação 2,5 + 50 mg, a partir da concentração nominal utilizada (C1= 40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino).

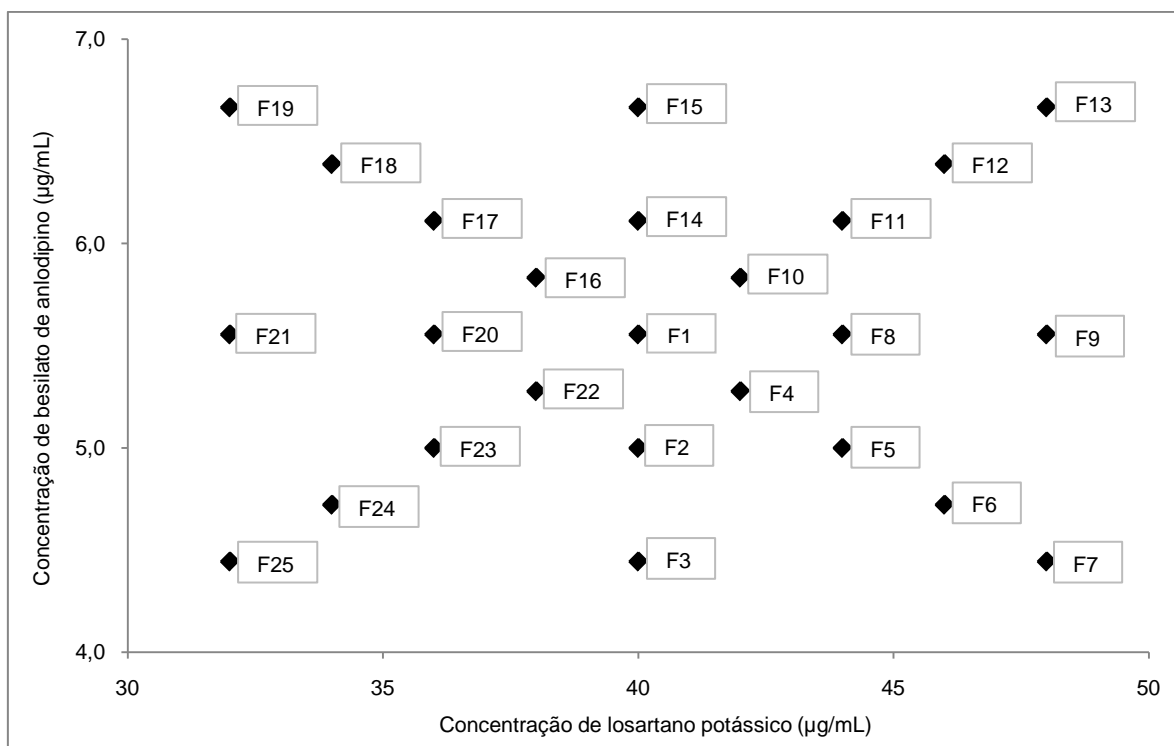


FIGURA 11 - Conjunto de amostras utilizadas na montagem dos modelos multivariados, apresentando a variação das concentrações dos fármacos para a apresentação 5 + 50 mg, a partir da concentração nominal utilizada (F1= 40 µg/mL de losartano potássico e 5,556 µg/mL de besilato de anlodipino).

Os espectros foram obtidos por varredura realizada nas regiões de 200 a 400 nm, utilizando cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, velocidade de escaneamento média, com leituras a cada 0,5 nm.

Para as leitura do branco, assim como para a cubeta referência, foi utilizado o mesmo solvente de leitura das amostras, seguindo a escolha do solvente, conforme demonstrado à frente.

4.2.4.1 Escolha do solvente para análises de espectroscopia na região do ultravioleta

Como uma das propostas iniciais desse trabalho era obter uma metodologia com menor geração de resíduos, ou geração de resíduos menos tóxicos, para a análise simultânea dos fármacos em questão, foram realizados vários testes com o objetivo de definir o solvente, ou mistura de solventes e/ou soluções, mais

apropriados para o preparo das amostras a serem submetidas à análise por espectrofotometria na região do ultravioleta.

O objetivo nessa etapa foi encontrar um solvente que promovesse uma solubilização dos fármacos na apresentação farmacêutica, com valores de quantificação por CLAE dos dois fármacos próximos ao obtido utilizando a metodologia desenvolvida por Pedroso (2009).

Para os testes de escolha do solvente foi empregada a apresentação comercial contendo 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.

Para cada solvente ou mistura testada, uma solução semelhante à *solução amostra A* foi preparada uma vez, sendo posteriormente preparada uma triplicata da diluição. As diluições foram injetadas uma única vez no cromatógrafo.

As soluções dos padrões também foram preparadas uma única vez, semelhante às *soluções padrão LP-C* e *BA-C*, sendo estas utilizadas no preparo das diluições em triplicata. Essas soluções também foram injetadas uma única vez no cromatógrafo.

O valor final de quantificação obtido corresponde à média aritmética dos três resultados.

Dentre os solventes testados no preparo das soluções, além da mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v) (PEDROSO *et al.*, 2009), foram utilizados metanol, etanol e água, ou misturas destes.

4.2.4.1.1 Teste com mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v)

Inicialmente, foi testada a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v), empregada por Pedroso (2009), que desenvolveu um método validado por CLAE para esse medicamento.

As concentrações finais dos fármacos utilizadas (40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino), também foram as definidas por Pedroso (2009).

4.2.4.1.2 Testes com metanol

Segundo dados constantes nas farmacopéias (PORTUGAL, 2002; THE UNITED States Pharmacopeia, 2006; BRITISH Pharmacopoeia 2007, 2007), para as matérias-primas de ambos os fármacos, o metanol é o solvente mais indicado para trabalho. Portanto, foram realizadas análises com metanol puro como solvente.

No primeiro teste realizado com metanol (teste A) foi preparada uma solução semelhante à *solução amostra A* e diluída com metanol até a concentração de 40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino.

Enquanto isso, novo levantamento foi realizado e encontrado um trabalho científico que fazia uso do acréscimo de padrão do besilato de anlodipino (PATIL *et al.*, 2009b), pois essa substância está em concentração muito inferior ao losartano potássico na associação (20 vezes menos). Partindo-se desse trabalho, foram então realizados novos testes com o acréscimo de padrão de besilato de anlodipino para atingir as proporções de 1:1 (teste B) e 2:1 (teste C), de losartano potássico:besilato de anlodipino, utilizando ainda metanol como solvente.

Para os testes B e C, após o conteúdo das cápsulas ter sido triturado, foi pesado o equivalente a dois pesos médios do pó e a este foi acrescido padrão de besilato de anlodipino em pó, conforme cada teste, antes do processo de solubilização dos fármacos. Essas amostras foram preparadas com 30 minutos de banho de ultrassom.

Após diluição com metanol, as concentrações finais das soluções foram 7,5 µg/mL de losartano potássico e 7,5 µg/mL de besilato de anlodipino (teste B) e 15 µg/mL de losartano potássico e 7,5 µg/mL de besilato de anlodipino (teste C).

4.2.4.1.3 Teste com água e misturas metanol:água

Ainda buscando solventes de baixa toxicidade, foram realizados testes com água e misturas metanol:água.

As proporções da mistura metanol:água foram 50:50, 65:35 e 85:15 (v/v).

Em todos os testes, as concentrações finais dos fármacos foram 40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino.

4.2.4.1.4 Teste com etanol e mistura etanol:água

O etanol foi escolhido para a próxima etapa dessa seleção do solvente, por ser um solvente de baixo custo, de baixa toxicidade e fácil de trabalhar, pois apresenta rápida filtração.

Além do etanol puro, também foi testada uma mistura etanol:água 1:1 para a solubilização dos fármacos da associação.

As concentrações finais dos fármacos foram 40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino.

4.2.4.1.5 Teste com mistura etanol:acetonitrila

Ainda foi testada outra mistura, composta por etanol:acetonitrila 90:10 (v/v).

As concentrações finais dos fármacos foram 40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino.

4.2.4.1.6 Escolha do solvente de diluição

Ainda com o objetivo de diminuir a geração de resíduos tóxicos, outra proposta foi a redução do uso da acetonitrila na preparação das *soluções amostra C1 a C25 e F1 a F25*.

Foi realizado um novo teste, onde, após o preparo da *solução amostra A*, a *solução amostra C1* foi diluída com um solvente diferente.

Os solventes usados nessa fase foram etanol, metanol e água. Para fins de comparação, foi preparada uma amostra controle, onde a mistura diluente utilizada foi acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v).

4.2.5 Calibração multivariada - modelamento e validação

O modelo multivariado de calibração foi desenvolvido por uma rotina de regressão de mínimos quadrados parciais (*Partial Least Square* - PLS), utilizando o programa PLS-toolbox 1.5, que opera em ambiente MATLAB 7.0.1.

Antes de início do modelamento propriamente dito, os dados espectrais das 25 *soluções amostras C1 a C25* ou das 25 *soluções amostras F1 a F25* foram submetidos à rotina de Análise de Componentes Principais (*Principal Components Analysis* - PCA) para a escolha do conjunto de validação. O conjunto de validação foi escolhido partindo-se das amostras mais próximas ao ponto central.

Para a otimização do número de variáveis latentes foi utilizada a rotina de validação cruzada denominada *leave-one-out*. Neste procedimento, as amostras que fazem parte do conjunto de calibração são retiradas uma a uma para serem utilizadas como elementos de previsão (FERREIRA *et al.*, 1999). A capacidade preditiva do modelo foi analisada nas soluções amostras do próprio conjunto de calibração, calculando-se o erro médio de previsão (*mean square error of prediction* - MSEP), dado pela fórmula:

$$\text{MSEP} = \sum (y' - y)^2$$

e pela raiz quadrada do erro médio de previsão (*root mean square error of prediction* - RMSEP), dada pela fórmula:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\sum [(y' - y)^2 / n]}$$

onde y' é o valor teórico, y é o valor calculado e n é o número de amostras.

Em geral, estima-se que o melhor número de variáveis latentes é aquele que proporciona o menor valor para a somatória dos quadrados dos erros de previsão (FERREIRA *et al.*, 1999). Além disso, quando é utilizado um menor número de variáveis latentes, pode ser conferida ao modelo uma maior robustez (CORDEIRO, 2011).

A presença de anomalias no conjunto de calibração foi avaliada por meio das grandezas *leverage* e resíduo de Student. Considerando-se uma distribuição normal e um nível de confiança de 95%, o valor limite para o parâmetro de resíduo de Student corresponde a $\pm 2,5\%$. O valor máximo permitido para o parâmetro *leverage* é obtido pela expressão:

$$3VL/n$$

onde, VL corresponde ao número de variáveis latentes (componentes principais) e n ao número de amostras utilizadas (FERREIRA *et al.*, 1999).

4.2.6 Análise estatística

Inicialmente, os dados de quantificação obtidos empregando os modelos foram analisados com relação às médias, desvios padrão e coeficiente de variação.

Quando apropriado, foi realizado teste T, para visualização de diferenças entre populações de dados.

4.2.7 Validação do modelo de calibração multivariada

Algumas figuras de mérito foram avaliadas conforme as orientações técnicas para modelos univariados. Foram estas a precisão (intracorrída e intercorrídas), a exatidão e a robustez (relacionada ao pH, à temperatura de leitura e à estabilidade dos fármacos na solução de leitura).

O processo de validação segue as orientações técnicas das normas nacionais (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010) e recomendações internacionais (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005; LABCOMPLIANCE, 2010).

Em modelos de calibração multivariada, a avaliação de algumas figuras de mérito, como a linearidade, o intervalo e a seletividade, são verificados de uma forma diferente daquela realizada nos métodos univariados. Neste trabalho, a linearidade, expressa como valor de coeficiente de correlação (r^2) foi avaliada através de cálculos realizados a partir de dados obtidos do software MATLAB.

O intervalo de concentração, que deve variar de 80 a 120% do valor nominal dos fármacos, foi definido na montagem do conjunto de calibração, não tendo sua validação realizada (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH, 2005; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

Para a validação, foram preparadas *soluções de validação A* ou *D*, conforme a apresentação a ser validada (2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico ou 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico) (item 4.2.1.1.4.a), p. 68 e item 4.2.1.2.4.a), p. 72). As *soluções de validação A* ou *D* foram preparadas em replicatas conforme descrito nos itens abaixo e foram avaliadas primeiramente por CLAE para quantificação dos fármacos. Em seguida as soluções foram submetidas à análise em espectrofotômetro na região do ultravioleta, por varredura entre 200 e 400 nm, da mesma forma que o realizado para as amostras do conjunto de calibração. Os dados espectrais obtidos foram submetidos ao respectivo modelo de calibração multivariada, para cálculo da quantificação conseguida pelo modelo.

4.2.7.1 Precisão

A precisão foi avaliada através da repetitividade (precisão intracorrida) e também através da precisão intermediária (precisão intercorrida).

4.2.7.1.1 Repetitividade

Para esse parâmetro, as medidas foram realizadas em seis amostras da *solução de validação A* ou *D*, por um mesmo analista, num curto período de tempo, para cada uma das apresentações avaliadas. Foram realizadas duas avaliações, em um mesmo dia (aproximadamente 6 h de intervalo), e os resultados das avaliações foram comparados. Foram considerados satisfatórios valores com coeficiente de variação inferior a 5%, com grau de confiança de 95%, referentes aos valores de quantificação obtidos pelo modelo de calibração multivariada.

4.2.7.1.2 Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi avaliada por dois analistas. Para tal, cada analista preparou as respectivas *soluções de validação*, em sextuplicata. Cada analista realizou o procedimento em um dia diferente.

Foram considerados satisfatórios valores com coeficiente de variação inferior a 5%, com grau de confiança de 95%, referentes aos valores de quantificação obtidos pelo modelo de calibração multivariada.

4.2.7.2 Exatidão

Como nem todos os excipientes e nem os dados necessários para a manipulação de uma amostra placebo fortificada pelos padrões (quantidades dos excipientes presentes na forma farmacêutica) estavam disponíveis, esta figura de mérito foi avaliada pela metodologia da adição de padrão à amostra, conforme descrito pela ANVISA (2003) e ICH (2005).

Para essa avaliação, três soluções de validação foram preparadas, para cada concentração teste. As *soluções de validação A* ou *D* foram preparadas conforme descrito no item 4.2.1.1.4.a) (p. 68) e no item 4.2.1.2.4.a) (p. 72).

A segunda *solução de validação* foi preparada pela adição de 1,0 mL da *solução padrão LP-B* e 1,0 mL da *solução padrão BA-B* ou *BA-E* na *solução de validação A* ou *D*, conforme a apresentação comercial utilizada, atingindo assim 10% a mais de cada um dos dois fármacos, apresentando as concentrações finais de 3,056 µg/mL de besilato de anlodipino e 44 µg/mL de losartano potássico para a apresentação 2,5 + 50 mg, e 6,112 µg/mL de besilato de anlodipino e 44 µg/mL de losartano potássico para a apresentação 5 + 50 mg.

A terceira *solução de validação* foi preparada pela adição de 2,0 mL da *solução padrão LP-B* e 2,0 mL da *solução padrão BA-B* ou *BA-E* na *solução de validação A* ou *D*, conforme a apresentação comercial utilizada, atingindo 20% a mais de cada um dos dois fármacos, apresentando as concentrações finais de 3,334 µg/mL de besilato de anlodipino e 48 µg/mL de losartano potássico para a apresentação 2,5 + 50 mg, e 6,667 µg/mL de besilato de anlodipino e 48 µg/mL de losartano potássico para a apresentação 5 + 50 mg.

As soluções preparadas foram submetidas à análise em espectrofotômetro na região do ultravioleta. Os dados espectrais obtidos foram submetidos à rotina de PLS, no MATLAB. Os valores de quantificação obtidos foram então analisados, através de percentual de quantificação, utilizando a fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

onde a concentração teórica é o valor calculado pelo doseamento em CLAE e a concentração média experimental é o valor da quantificação obtido ao se submeter os dados dos espectros obtidos ao modelo de calibração multivariada.

Foram considerados satisfatórios valores de exatidão entre 98 e 102% para o losartano potássico e entre 97 e 103% para o besilato de anlodipino (LABCOMPLIANCE, 2010).

4.2.7.3 Robustez

A robustez de um método avalia sua capacidade de resistência, frente a pequenas e deliberadas variações.

Para a avaliação desta figura de mérito, são aceitos os mesmos critérios dos parâmetros de precisão e exatidão. Neste trabalho, foi verificada a robustez relacionada ao pH, à temperatura de leitura e ao tempo entre o preparo da solução de leitura e a aquisição dos dados no espectrofotômetro (estabilidade dos fármacos na solução utilizada para leitura no espectrofotômetro).

4.2.7.3.1 Robustez relacionada ao pH

Para avaliação do parâmetro pH, foi utilizada uma variação de $\pm 0,2$ unidades de pH, em relação ao valor de trabalho definido para o tampão, pH 3,0.

Essa variação no valor do pH refere-se somente à variação do pH da solução tampão utilizado na mistura diluente, empregada na solubilização dos fármacos na forma farmacêutica previamente triturada. O ajuste dessa solução tampão foi realizado por adição de solução aquosa de ácido fosfórico.

Para essa avaliação, as seguintes *soluções de validação A* ou *D* foram preparadas: uma solução utilizando mistura diluente acetonitrila:tampão fosfato pH 2,8 50:50 (v/v); uma solução utilizando mistura diluente acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v); e uma solução utilizando mistura diluente acetonitrila:tampão fosfato pH 3,2 50:50 (v/v). Todas as soluções de validação foram preparadas em triplicata.

Após a aquisição dos espectros na região do ultravioleta, os dados espectrais foram submetidos à rotina de PLS, no MATLAB. Os valores de

quantificação obtidos foram então analisados estatisticamente, utilizando-se teste T e coeficiente de variação (CV), sendo considerados satisfatórios os resultados conforme os parâmetros de precisão e exatidão.

4.2.7.3.2 Robustez relacionada à temperatura de leitura

Para esse parâmetro, foram definidas, além da temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), uma temperatura mais baixa ($18 \pm 2^\circ\text{C}$) e uma temperatura mais elevada ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) para leitura.

Soluções de validação A ou D, em triplicata, foram preparadas para cada temperatura avaliada. As *soluções de validação* foram então deixadas sob refrigeração ou em banho-maria, até que atingissem as temperaturas acima, para a realização das leituras. Estas soluções foram imediatamente submetidas à obtenção do espectro na região do ultravioleta, mantendo-se a temperatura de leitura em cubas com água resfriada ou aquecida, conforme a necessidade.

Após a aquisição dos espectros na região do ultravioleta, os dados espectrais foram submetidos à rotina de PLS, no MATLAB. Os valores de quantificação obtidos foram então analisados estatisticamente, utilizando-se teste T e coeficiente de variação (CV), sendo considerados os resultados satisfatórios conforme os parâmetros de precisão e exatidão.

4.2.7.3.3 Robustez relacionada à estabilidade dos fármacos na solução de leitura

A avaliação deste parâmetro foi dividida em duas etapas: a avaliação da estabilidade da solução de leitura correspondente à *solução de validação D*, e a avaliação da estabilidade das soluções estoque dos padrões dos fármacos.

As *soluções estoque dos fármacos* e a *solução padrão diluída* foram preparadas da seguinte maneira:

Solução estoque padrão de besilato de anlodipino: Foram pesados 5,0 mg de padrão de besilato de anlodipino e transferidos para um balão volumétrico de

5 mL. O padrão foi solubilizado com mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v) e o volume completado com a mesma mistura. Concentração: 1,0 mg/mL.

Solução estoque padrão de losartano potássico: Foram pesados 25,0 mg de padrão de losartano potássico e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL. O padrão foi solubilizado com mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v) e o volume completado com a mesma mistura. Concentração: 1,0 mg/mL.

Solução padrão diluída: Em um balão volumétrico de 10 mL foram adicionados 55 µL da *solução estoque padrão de besilato de anlodipino* e 400 µL da *solução estoque padrão de losartano potássico*. O volume foi completado com água. Concentração: 5,556 µg/mL de besilato de anlodipino e 40 µg/mL de losartano potássico.

Nos dois casos (*solução de validação D* e *solução padrão diluída*), as amostras foram analisadas em diferentes momentos no dia da preparação ou em dias subsequentes, nos tempos 0 hora (ou imediatamente após o preparo), 4 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 1 semana.

Em todos os dias de análise, novas soluções estoque e soluções diluídas dos padrões foram preparadas, mantendo-se a concentração de leitura para efeitos de comparação.

Todas as *soluções de validação* foram avaliadas em sextuplicata de leitura.

Após a aquisição dos espectros na região do ultravioleta, os dados espectrais foram submetidos à rotina de PLS, no MATLAB. Os valores de quantificação obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se teste T e coeficiente de variação (CV), sendo considerados os resultados satisfatórios conforme os parâmetros de precisão e exatidão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a montagem do modelo de calibração multivariada foi utilizado o medicamento comercial (LOTAR® - Biossintética) no preparo das *soluções amostras*, para que os modelos fossem desenvolvidos na presença dos excipientes, uma vez que esses constituem um grande número de compostos (QUADRO 3), além de serem responsáveis pela maior parte do peso médio da cápsula (quase 70%). Para que isso pudesse ser realizado, durante o desenvolvimento, toda vez que foi preparada uma nova *solução amostra A* ou *D*, foi também realizada a quantificação dos fármacos por metodologia validada (PEDROSO *et al.*, 2009).

Lactose monohidratada	Macrogol
Celulose microcristalina	Talco
Croscarmellose sódica	Dióxido de titânio
Estearato de magnésio	Amido
Álcool polivinílico	Corante amarelo FDC nº 6 laca de alumínio
	Corante azul FDC nº 1 laca de alumínio*

QUADRO 3 - Excipientes da fórmula base do medicamento comercial (*Somente para as apresentações 5 + 50 mg e 5 + 100 mg).

5.1 QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS PRESENTES NO MEDICAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A análise da associação de anti-hipertensivos, apresentação de 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, foi realizada por CLAE, conforme Pedroso e colaboradores (2009), obtendo dados de doseamento conforme o previsto: 101,42% de besilato de anlodipino e 99,04% de losartano potássico. O cromatograma desta quantificação está demonstrado na FIGURA 12.

Para análise da apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, foi utilizada a mesma metodologia, obtendo-se resultados de 101,47% de besilato de anlodipino e 102,77% de losartano potássico (FIGURA 13).

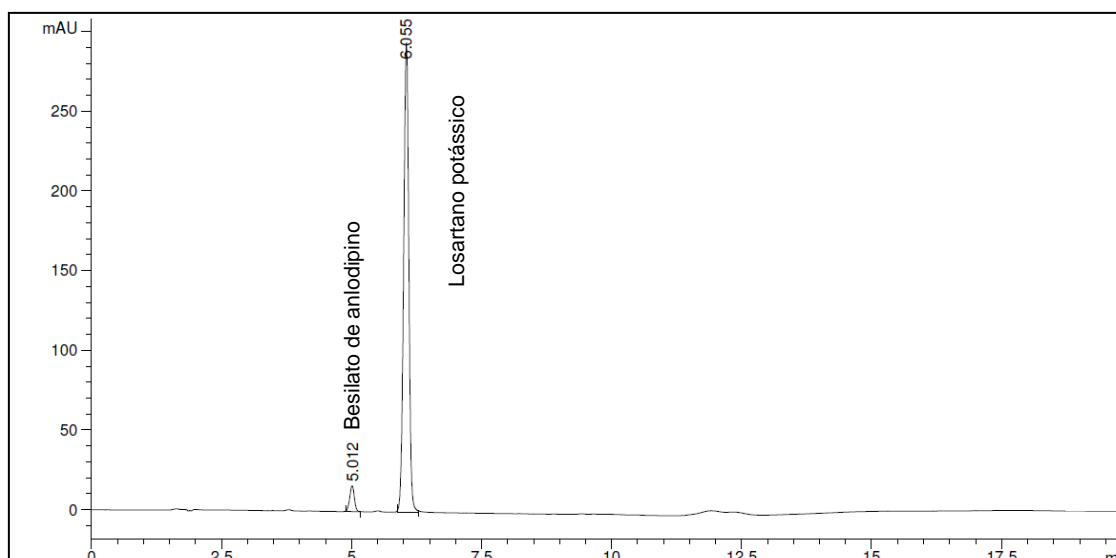


FIGURA 12 - Cromatograma dos fármacos presentes no medicamento comercial, apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (Condições cromatográficas: Coluna C18, 150 x 4,6 mm, 5 μ m, fase móvel acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0, eluição gradiente).

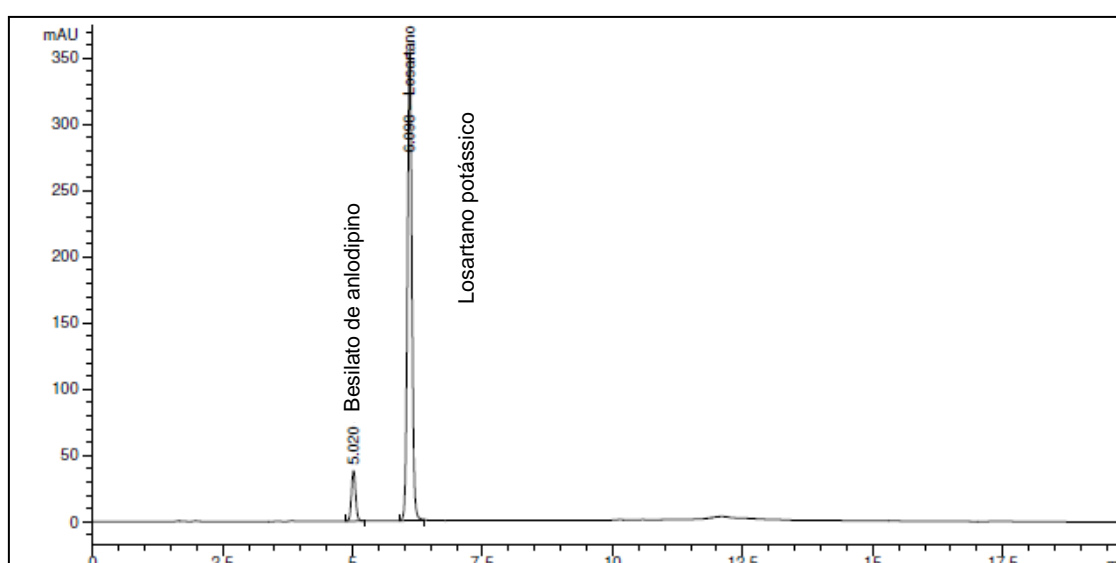


FIGURA 13 - Cromatograma dos fármacos presentes no medicamento comercial, apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (Condições cromatográficas: Coluna C18, 150 x 4,6 mm, 5 μ m, fase móvel acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0, eluição gradiente).

Os resultados obtidos nos doseamentos por CLAE das duas apresentações farmacêuticas do medicamento comercial foram utilizados na correção das concentrações das *soluções amostra* durante o desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada.

5.2 ANÁLISES PRELIMINARES NO ESPECTRÔMETRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A montagem do modelo de calibração multivariada utilizando os dados obtidos por espectrometria na região do infravermelho, utilizando o acessório de reflectância difusa, foi sugerida em virtude da facilidade de execução da metodologia e da baixa geração de resíduos. Assim, antes de iniciar a montagem do modelo, foi necessária a verificação da viabilidade em se utilizar este tipo de espectroscopia para análise do medicamento comercial.

Após o preparo das amostras, estas foram colocadas no espectrômetro para obtenção dos espectros. Na FIGURA 14, na FIGURA 15 e na FIGURA 16 os espectros dos padrões de besilato de anlodipino, de losartano potássico, da mistura dos dois padrões e do medicamento comercial podem ser visualizados.

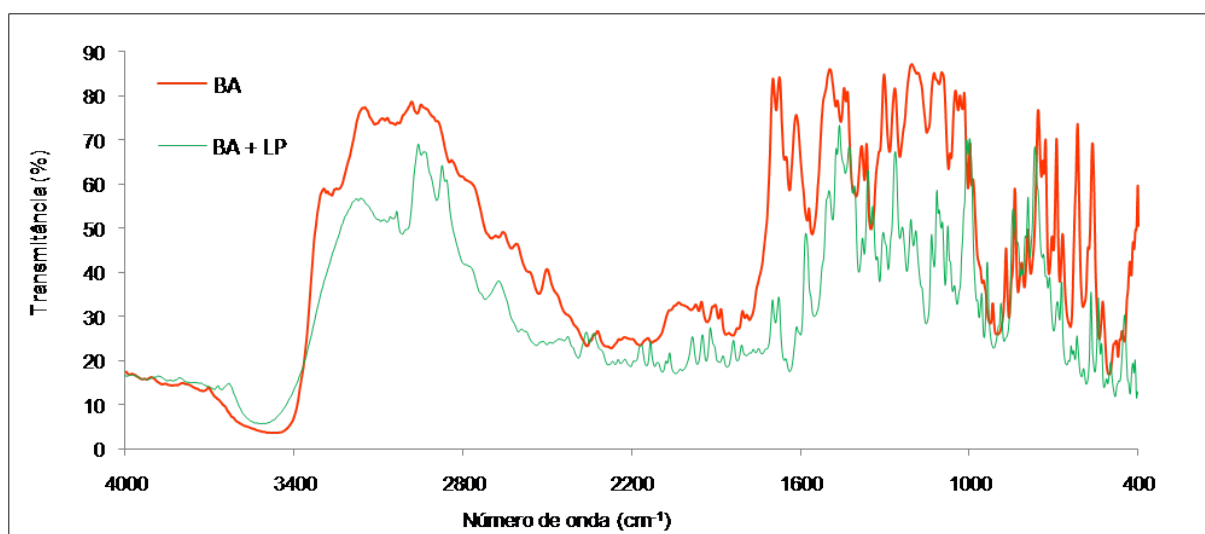


FIGURA 14 - Espectros na região do infravermelho dos fármacos, comparando padrão de besilato de anlodipino e mistura dos padrões dos fármacos, nas mesmas concentrações, em brometo de potássio (BA: padrão de besilato de anlodipino; BA + LP: mistura de padrões de besilato de anlodipino e losartano potássico).

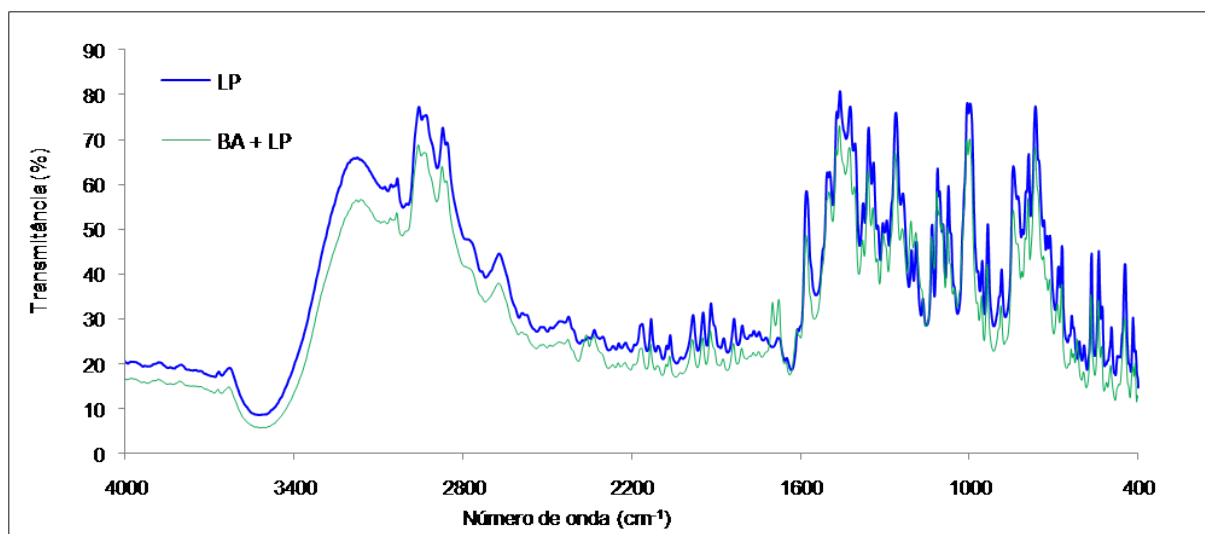


FIGURA 15 - Espectros na região do infravermelho dos fármacos, comparando padrão de losartano potássico e mistura dos padrões dos fármacos, nas mesmas concentrações, em brometo de potássio (LP: padrão de losartano potássico; BA + LP: mistura de padrões de besilato de anlodipino e losartano potássico).

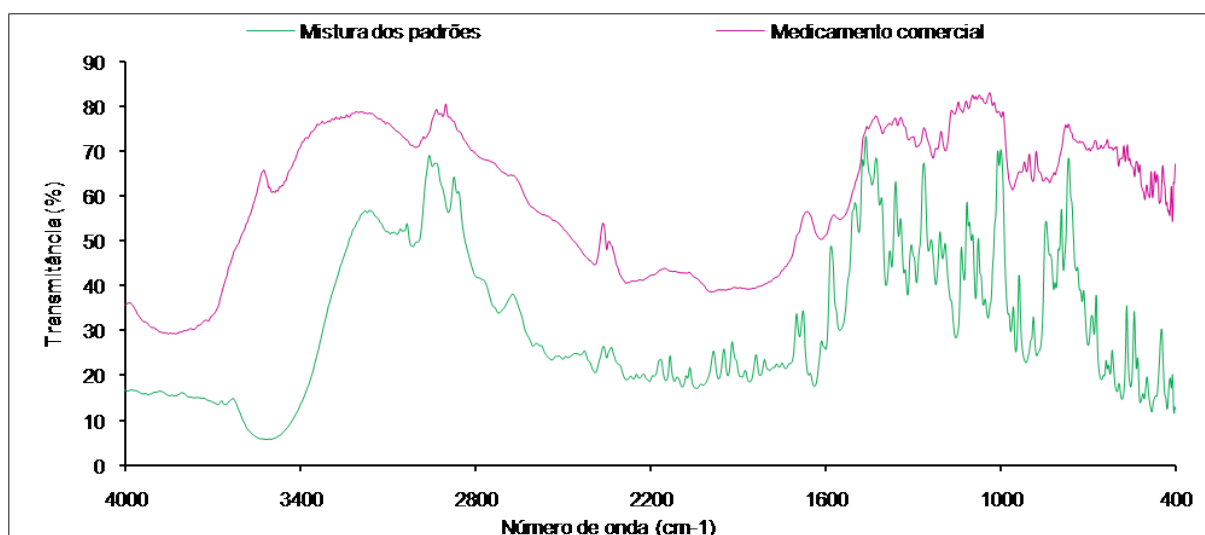


FIGURA 16 - Espectros na região do infravermelho dos fármacos, comparando mistura dos padrões e medicamento comercial, na apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, nas mesmas concentrações, em brometo de potássio.

Conforme se verifica na FIGURA 14 e na FIGURA 15, o perfil da mistura dos padrões possui sinais característicos dos dois fármacos. Entretanto, como as análises no espectrômetro de infravermelho são sensíveis a todas as substâncias químicas presentes na amostra, incluindo os excipientes do medicamento, o que se observa na FIGURA 16 é que, devido provavelmente à grande quantidade de excipientes presente na cápsula (aproximadamente 70%), as bandas características dos fármacos apresentaram-se muito atenuadas na amostra do medicamento

comercial, o que impossibilitaria a utilização da forma farmacêutica como base para a montagem de um modelo de calibração multivariada para quantificação.

Uma vez que as leituras no espectrofotômetro na região do ultravioleta foram mais específicas para os fármacos, praticamente não apresentando interferência dos excipientes, decidiu-se dedicar os esforços nesta metodologia e, por hora, não realizar os experimentos para quantificação por espectroscopia na região do infravermelho.

5.3 ANÁLISES NO ESPECTROFOTÔMETRO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

5.3.1 Escolha do solvente

Todos os testes descritos nesse item foram realizados com as *soluções amostra A*, ou seja, de soluções que utilizaram como base a apresentação comercial.

Inicialmente, foi preparado o conjunto de *soluções amostra C1* a *C25*, utilizando como solvente metanol puro, deixando por 30 minutos em banho de ultrassom. O conjunto foi levado à leitura no espectrofotômetro e foi verificada uma diferença entre os espectros da *solução amostra C1* e da mistura das *soluções padrão LP-B* e *BA-B* na mesma concentração da *solução amostra C1*, conforme o que pode ser verificado na FIGURA 17. Dessa forma, o procedimento de solubilização dos fármacos, na presença dos excipientes da cápsula, foi alterado para 30 minutos de agitação mecânica seguido de mais 30 minutos em banho de ultrassom.

Ficou definido como solvente de escolha para a solubilização dos fármacos a partir do conteúdo triturado das cápsulas, a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v), baseando-se nos resultados obtidos nos testes realizados com os diferentes solventes ou misturas, conforme será discutido a seguir.

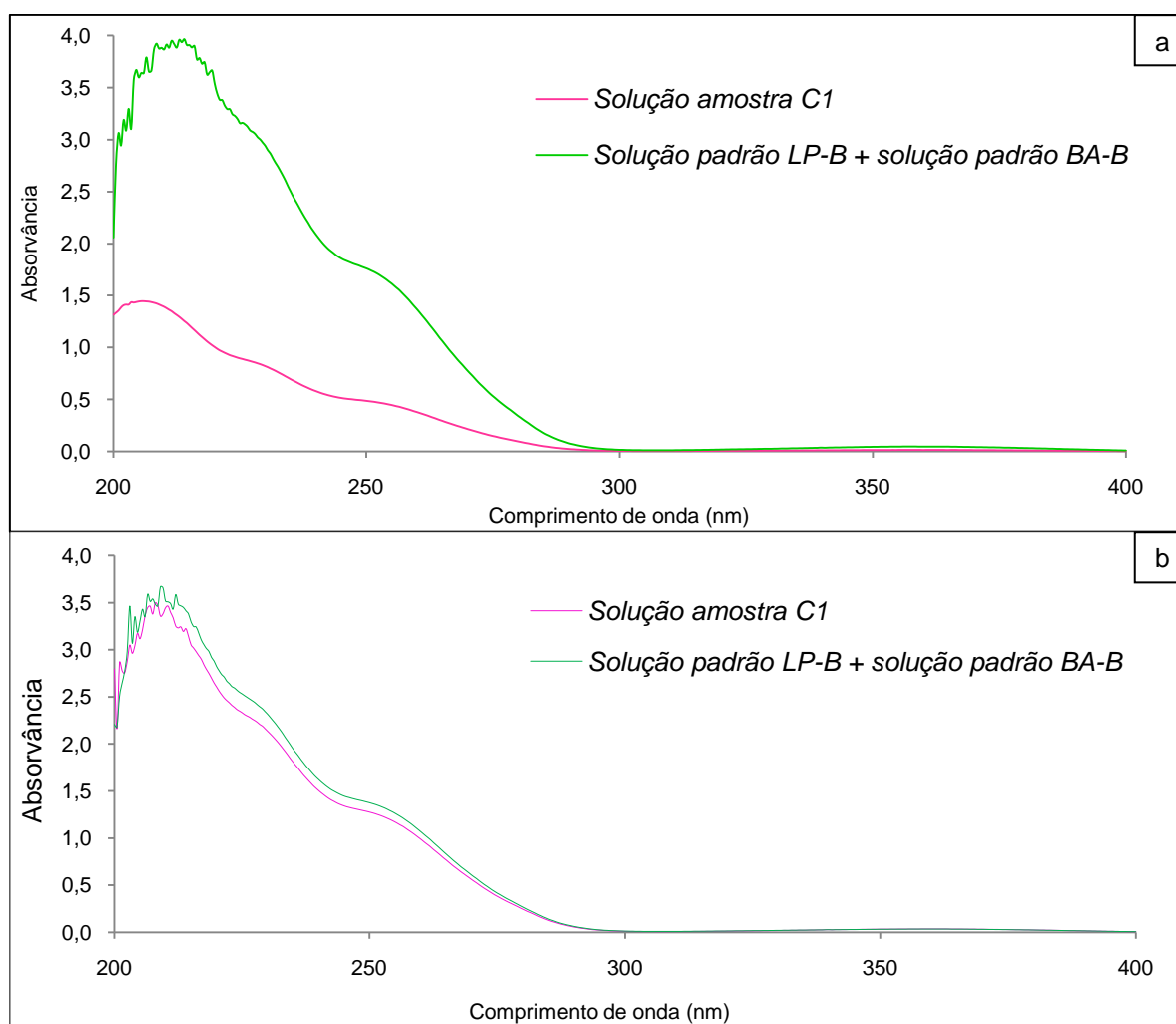


FIGURA 17 - Espectros na região do ultravioleta da *solução amostra C1* e da mistura das *soluções padrão LP-B* e *BA-B*, demonstrando a diferença espectral obtida com diferentes tempos e tipos de agitação: a) 30 minutos de agitação em banho de ultrassom; b) 30 minutos de agitação mecânica mais trinta minutos de agitação em banho de ultrassom.

5.3.1.1 Teste com mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v)

Esse sistema solvente já havia sido empregado por Pedroso (2009), no desenvolvimento de método por CLAE para esse medicamento. Como parâmetro de comparação para os outros solventes testados, foi realizada a quantificação da *solução amostra C1* e o resultado obtido está expresso na TABELA 8.

TABELA 8 - Quantificação dos fármacos determinada por CLAE nos testes com mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v) durante a escolha do solvente para análises por espectroscopia na região do ultravioleta (n = 3)

Mistura	Quantificação do losartano potássico (% \pm DPR*)	Quantificação do besilato de anlodipino (% \pm DPR*)
Acetonitrila:Tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v)	100,74 \pm 0,92	100,48 \pm 0,06

Concentração de leituras dos fármacos na amostra: 40 μ g/mL de losartano potássico e 2,778 μ g/mL de besilato de anlodipino.

*DPR = Desvio padrão relativo.

A mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v), apesar de não atender ao nosso objetivo da redução da geração de resíduos, apresentou uma solubilização adequada de ambos os fármacos (próximo a 100%).

5.3.1.2 Testes com metanol

Os resultados das quantificações por CLAE das soluções amostra empregando metanol como solvente de solubilização estão representados na TABELA 9.

TABELA 9 - Quantificação dos fármacos determinada por CLAE nos testes com solvente metanol durante a escolha do solvente para análises por espectroscopia na região do ultravioleta (n = 3)

Solvente	Quantificação do losartano potássico (% \pm DPR*)	Quantificação do besilato de anlodipino (% \pm DPR*)
Metanol puro - Teste A	93,24 \pm 0,29	104,37 \pm 0,05
Metanol puro - Teste B	84,50 \pm 0,05	89,24 \pm 0,21
Metanol puro - Teste C	93,37 \pm 0,03	88,14 \pm 0,55

Concentração de leituras dos fármacos nas amostras:

Teste A: 40 μ g/mL de losartano potássico e 2,778 μ g/mL de besilato de anlodipino.

Teste B: 7,5 μ g/mL de losartano potássico e 7,5 μ g/mL de besilato de anlodipino.

Teste C: 15 μ g/mL de losartano potássico e 7,5 μ g/mL de besilato de anlodipino.

*DPR = Desvio padrão relativo.

Embora o metanol seja sugerido como solvente de trabalho para análises das matérias-primas (PORTUGAL, 2002; THE UNITED States Pharmacopeia, 2006; BRITISH Pharmacopoeia 2007, 2007), na presença de outros compostos

(excipientes e/ou padrões) este solvente não se mostrou eficiente na solubilização dos fármacos do medicamento, pois os resultados de quantificação obtidos foram muito diferentes daqueles obtidos empregando a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v), ou seja, foram distantes do ideal (100%). Dessa forma o metanol puro foi excluído como solvente.

Com esses resultados, foram consideradas novas opções de solventes para a solubilização dos fármacos, tais como a água ou misturas de metanol e água.

5.3.1.3 Testes com água e misturas metanol:água

Os resultados da quantificação das soluções nas quais foram empregadas água e misturas metanol:água para solubilização dos fármacos no pó das cápsulas estão relacionados na TABELA 10. Tendo em vista a não geração de resíduos e menor toxicidade, a água seria o melhor solvente a ser empregado no desenvolvimento do método. No entanto, quando foi empregada água, a quantificação do besilato de anlodipino foi de 0%. Embora as farmacopéias relatem uma solubilidade baixa em água (cerca de 1 a 10 µg/mL), o besilato de anlodipino não se solubilizou em água na presença de excipientes.

TABELA 10 - Quantificação dos fármacos determinada por CLAE nos testes com solvente água e misturas metanol:água durante a escolha do solvente para análises por espectroscopia na região do ultravioleta (n = 3)

Solvente	Quantificação do losartano potássico (% ± DPR*)	Quantificação do besilato de anlodipino (% ± DPR*)
Água	93,32 ± 0,28	0,0
Metanol:água 50:50 (v/v)	97,77 ± 0,68	101,36 ± 0,12
Metanol:água 65:35 (v/v)	95,50 ± 0,37	99,33 ± 0,17
Metanol:água 85:15 (v/v)	92,14 ± 0,06	105,35 ± 0,26

Concentração de leituras dos fármacos nas amostras:

Todos os testes: 40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino.

*DPR = Desvio padrão relativo.

Da mesma forma, as porcentagens de quantificação conseguidas com as misturas metanol:água, nas proporções estudadas, também não foram consideradas

satisfatórias, obtendo-se resultados distantes daqueles obtidos quando se empregou mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v) (aproximadamente 100%). Assim, tanto a água como estas misturas de solventes foram descartadas nos próximos testes.

5.3.1.4 Teste com etanol e mistura etanol:água

Os resultados de quantificação encontrados nesses testes estão apresentados na TABELA 11.

TABELA 11 - Quantificação dos fármacos determinada por CLAE nos testes com solvente etanol e mistura etanol:água durante a escolha do solvente para análises por espectroscopia na região do ultravioleta (n = 3)

Solvente	Quantificação do losartano potássico (% \pm DPR*)	Quantificação do besilato de anlodipino (% \pm DPR*)
Etanol	88,44 \pm 0,37	98,18 \pm 0,06
Etanol:água 50:50	101,68 \pm 0,26	96,73 \pm 0,002

Concentração de leituras dos fármacos nas amostras:

Todos os testes: 40 μ g/mL de losartano potássico e 2,778 μ g/mL de besilato de anlodipino.

*DPR = Desvio padrão relativo.

Mais uma vez os dados de quantificação foram bastante diferentes daquele considerado ideal, comparando com o teste desenvolvido utilizando mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v). Com estes resultados, o etanol ou a sua mistura com água foram descartados para o preparo das *soluções amostras* e *soluções padrão*.

5.3.1.5 Teste com mistura etanol:acetonitrila

Apesar de resultados considerados ruins nos testes empregando etanol ou mistura etanol:água 50:50 (v/v), tentou-se ainda empregar uma mistura de

etanol:acetonitrila 90:10 (v/v), uma vez que o teste no qual foi utilizada a acetonitrila [mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v)] apresentou bons resultados.

Entretanto, a quantificação obtida após a solubilização dos fármacos nesse teste foi baixa, ainda menor do que aquela encontrada quando somente o etanol foi utilizado, conforme o que se pode observar na TABELA 12.

TABELA 12 - Quantificação dos fármacos determinada por CLAE nos testes com mistura etanol:acetonitrila 90:10 (v/v) durante a escolha do solvente para análises por espectroscopia na região do ultravioleta (n = 3)

Solvente	Quantificação do losartano potássico (% \pm DPR*)	Quantificação do besilato de anlodipino (% \pm DPR*)
Etanol:acetonitrila 90:10 (v/v)	85,85 \pm 0,20	72,79 \pm 0,02

Concentração de leituras dos fármacos na amostra: 40 μ g/mL de losartano potássico e 2,778 μ g/mL de besilato de anlodipino.

*DPR = Desvio padrão relativo.

Dessa forma, também foi descartada essa mistura solvente para o preparo de novas *soluções amostras*.

5.3.1.6 Escolha do solvente de diluição

Após ter sido definida a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v) para a solubilização dos fármacos a partir do conteúdo triturado das cápsulas, esta foi empregada no preparo das *soluções amostra A, B, D e E* e no preparo das *soluções padrão*. Ainda com a intenção de utilizar solventes menos tóxicos no método desenvolvido, outros solventes foram testados no preparo das *soluções amostra C1 a C25 e F1 a F25*, reduzindo assim a geração de resíduos e o uso da acetonitrila.

Quatro *soluções amostra C1* foram preparadas, sendo o volume do balão completado com cada um dos seguintes solventes: *amostra a* - acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50(v/v) (solução controle); *amostra b* - metanol; *amostra c* - etanol; *amostra d* - água.

A amostra c, diluída com etanol, apresentou precipitação imediata de algum componente presente, provocando turvação da solução, que permaneceu mesmo

após filtração, inviabilizando sua leitura no espectrofotômetro. Esse solvente foi então substituído por uma mistura etanol:água 50:50 (v/v), com a qual a amostra preparada se apresentou aparentemente límpida, permitindo assim sua leitura.

As *soluções amostra* preparadas foram submetidas à varredura no espectrofotômetro na região do ultravioleta e os espectros sobrepostos (amostra controle e amostra teste) são apresentados na FIGURA 18.

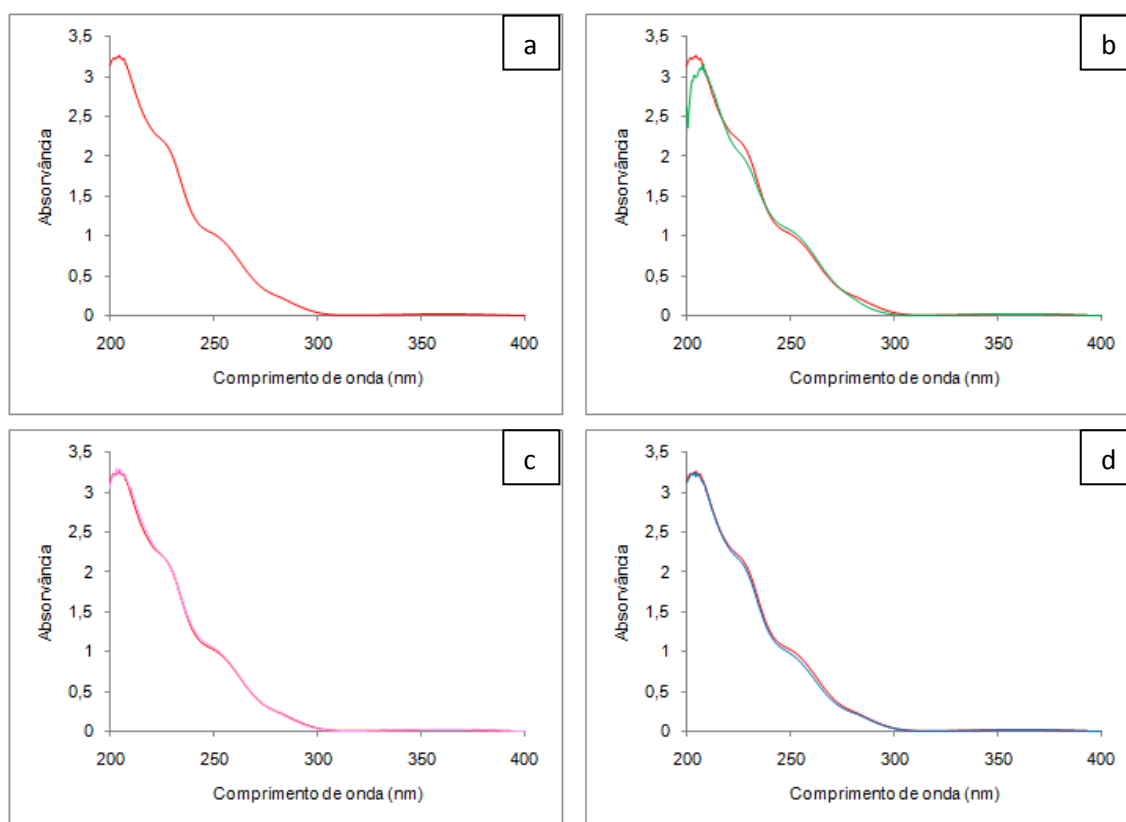


FIGURA 18 - Espectros na região do ultravioleta das *soluções amostra C1* (concentração 40 $\mu\text{g/mL}$ de losartano potássico e 2,778 $\mu\text{g/mL}$ de besilato de anlodipino), utilizando diferentes diluentes: (a) Espectro da solução de leitura, empregando acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 (solução controle); (b) Espectros sobrepostos das soluções controle e diluída com metanol; (c) Espectros sobrepostos das soluções controle e diluída com mistura etanol:água 50:50 (v/v); (d) Espectros sobrepostos das amostras controle e diluída com água.

Observando os espectros na FIGURA 18, concluiu-se que o espectro da solução diluída com a mistura etanol:água 50:50 (v/v) (FIGURA 18c) foi praticamente igual ao espectro da solução diluída com acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v) (FIGURA 18a), o que justificaria sua escolha como o solvente para preparo das 25 amostras do conjunto de calibração multivariada. Entretanto, pensando em diminuir o consumo de solventes orgânicos nesse trabalho, optou-se em utilizar a

água como solvente de diluição no preparo das soluções, pois seu espectro também ficou muito similar ao da solução que foi diluída com a mistura acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0 50:50 (v/v) (FIGURA 18d).

5.3.2 Obtenção dos dados espectrais para os conjuntos de dados para calibração multivariada

Inicialmente, foram realizadas análises no espectrofotômetro na região do ultravioleta da *solução amostra C1* e das *soluções padrão LP-C* e *BA-B*, isolados e em mistura, com a finalidade de se conhecer o perfil espectroscópico dos fármacos isolados e nas *soluções amostras*. Para tanto, as soluções foram diluídas de forma a atingir as concentrações nominais de leitura: 2,776 µg/mL de besilato de anlodipino e 40 µg/mL de losartano potássico. Os espectros são apresentados na FIGURA 19.

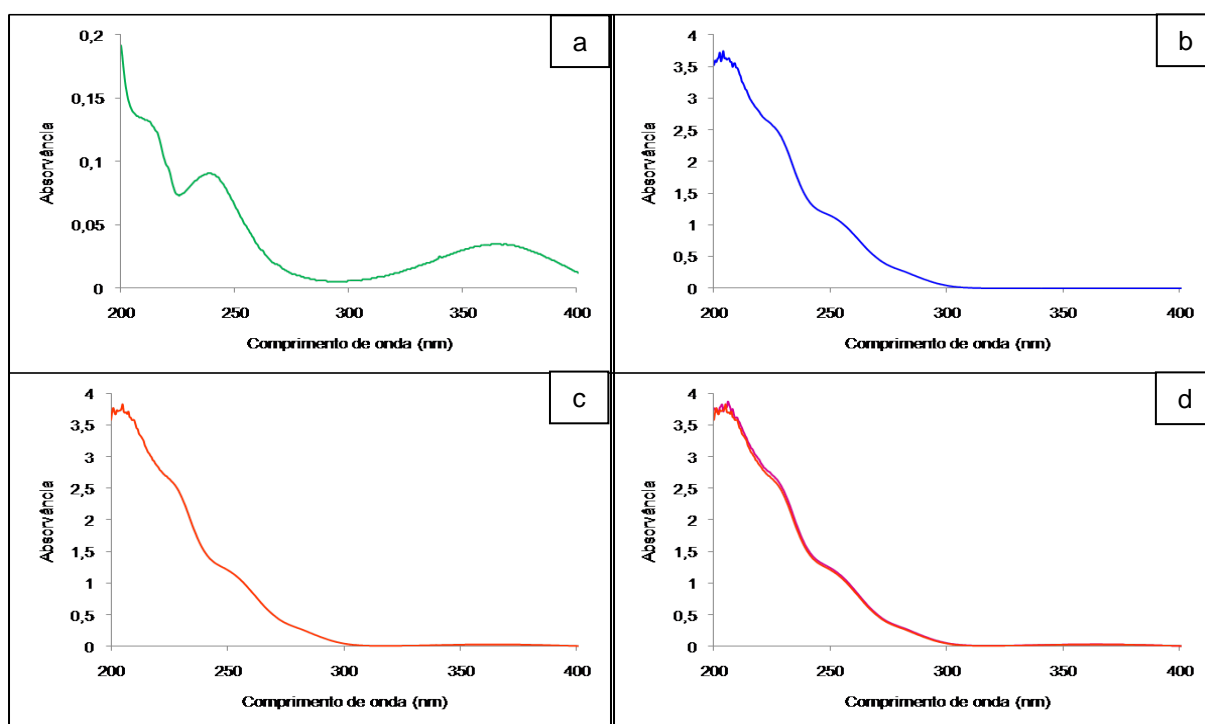


FIGURA 19 - Perfil espectroscópico dos fármacos, (a) na *solução padrão BA-B* diluída (concentração: 2,776 µg/mL de besilato de anlodipino); (b) na *solução padrão LP-C* diluída (concentração: 40 µg/mL de losartano potássico); (c) numa mistura das *soluções padrão LP-C* e *BA-B* diluídas (concentração: 2,776 µg/mL de besilato de anlodipino e 40 µg/mL de losartano potássico); e (d) na *solução amostra C1* (40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino).

Observando os perfis espectroscópicos dos padrões dos fármacos, podemos observar que há sobreposição de sinal, principalmente nas regiões entre 200 e 300 nm, o que poderia causar dificuldade no processo de quantificação univariado (FIGURA 20).

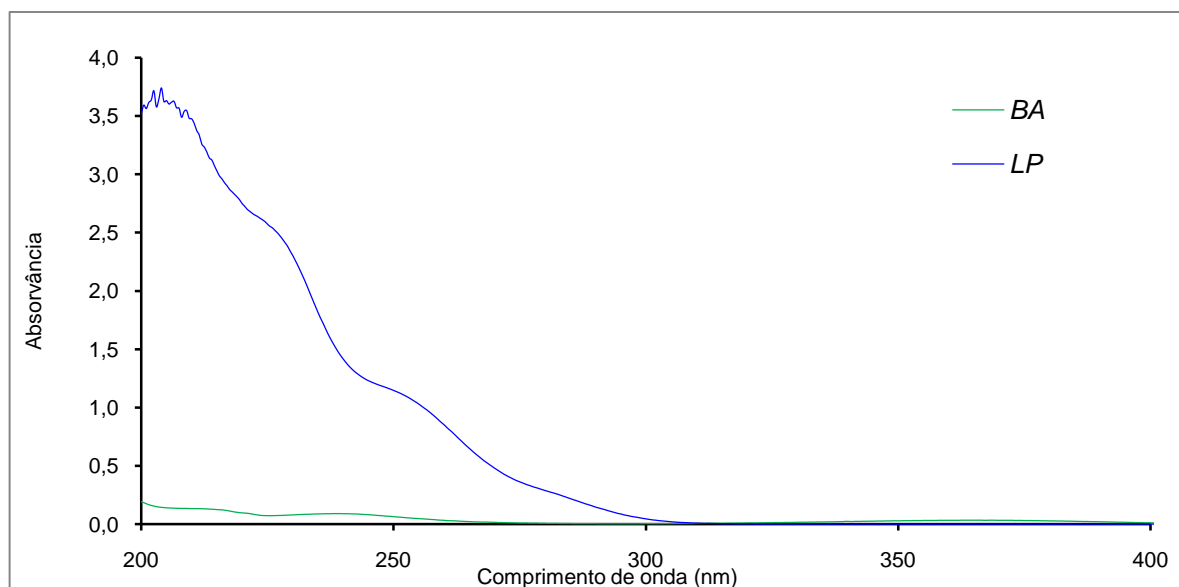


FIGURA 20 - Perfil espectroscópico dos fármacos em solução, apresentando sobreposição espectral na região entre 200 e 300 nm, aproximadamente. (Concentração dos fármacos: *LP* = 40 µg/mL de losartano potássico e *BA* = 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino).

A partir desses espectros, foi possível verificar que, para o padrão de besilato de anlodipino, na concentração final de leitura (2,778 µg/mL), o espectro obtido apresentou uma baixa absorvância (máximo de 0,2). Já para o padrão de losartano potássico, na concentração de 40 µg/mL, apresentou absorvância elevada, sendo que acima de 230 nm os valores foram superiores a 2,0. O mesmo efeito foi observado nos espectros da mistura de padrões e do medicamento comercial na apresentação 2,5 + 50 mg. Isto poderia resultar em dificuldades em se quantificar o besilato de anlodipino na mistura. No entanto, no espectro deste se observa uma banda característica em 362 nm, sinal este detectado pelo espectrofotômetro e que poderia ser usado na quantificação pela calibração multivariada.

A utilização de uma solução mais concentrada poderia auxiliar na quantificação do anlodipino, aumentando seu sinal característico. No entanto, isso aumentaria muito o sinal do losartano, e a quantificação deste poderia ser prejudicada. Com esse dado, resolveu-se realizar a montagem do modelo de calibração multivariada para quantificar os fármacos na apresentação farmacêutica

comercial 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico utilizando como concentração nominal aquela contendo 40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino. Semelhantemente, para a apresentação farmacêutica comercial 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico foi definido como concentração nominal aquela contendo 40 µg/mL de losartano potássico e 5,556 µg/mL de besilato de anlodipino.

5.3.2.1 Obtenção dos dados espectrais do conjunto de amostras para o modelo de calibração multivariada para a apresentação farmacêutica comercial 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico

Após as definições do solvente de dissolução e de diluição dos fármacos e da concentração nominal de leitura para a montagem do modelo de calibração, as *soluções amostra C1 a C25* foram preparadas, sendo a concentração nominal aquela com 40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino (*solução amostra C1*). Os dados espectrais foram obtidos pela varredura entre 200 e 400 nm e os 25 espectros estão mostrados na FIGURA 21.

Os dados numéricos das absorvâncias foram então submetidos a uma rotina no programa MATLAB, para a montagem dos modelos de calibração multivariada, o que será discutido na sequência.

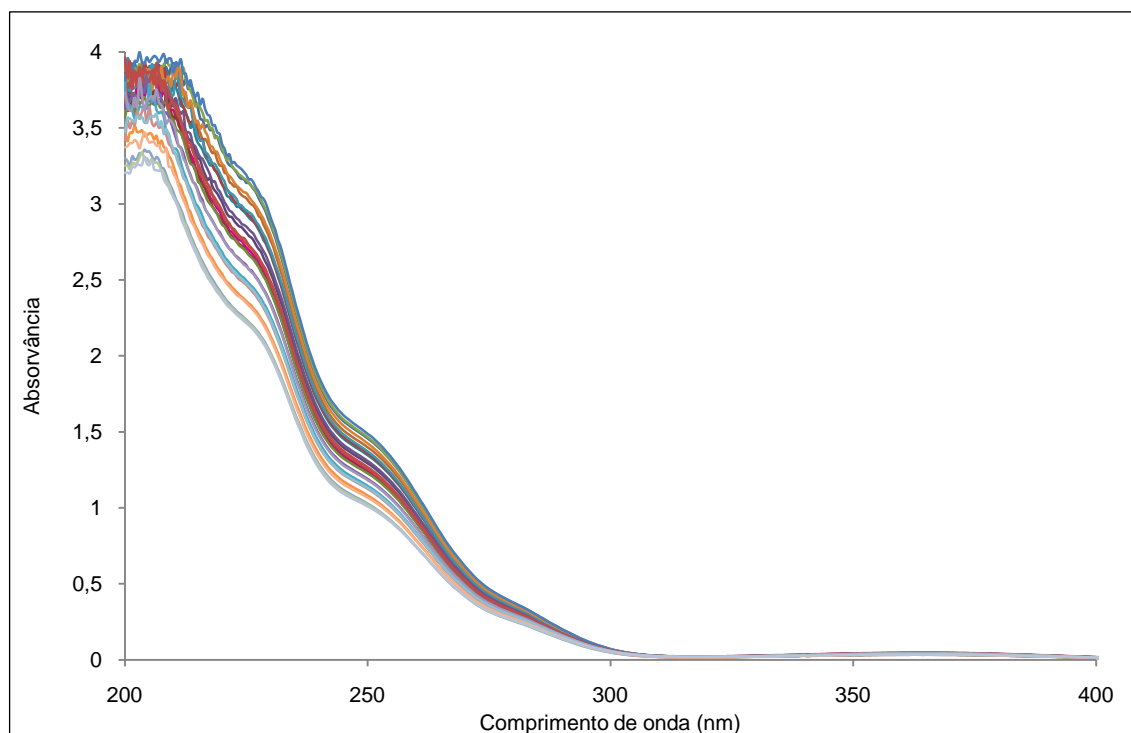


FIGURA 21 - Espectros na região do ultravioleta das *soluções amostra C1 a C25* do conjunto de calibração para quantificação dos fármacos no medicamento comercial, apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (Concentração nominal dos fármacos: 40 µg/mL de losartano potássico e 2,778 µg/mL de besilato de anlodipino).

5.3.2.2 Obtenção dos dados espectrais do conjunto de amostras para o modelo de calibração multivariada para a apresentação farmacêutica comercial 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico

Para a montagem do modelo de calibração multivariada para quantificação dos fármacos na apresentação comercial 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, foi necessário também o preparo de 25 soluções (*soluções amostra F1 a F25*), sendo a concentração nominal aquela com 40 µg/mL de losartano potássico e 5,556 µg/mL de besilato de anlodipino (*solução amostra F1*). Os espectros foram obtidos pela varredura das *soluções amostra F1 a F25*, entre 200 e 400 nm e os dados numéricos foram utilizados para montagem dos modelos de calibração multivariada.

A FIGURA 22 apresenta todos os 25 espectros obtidos.

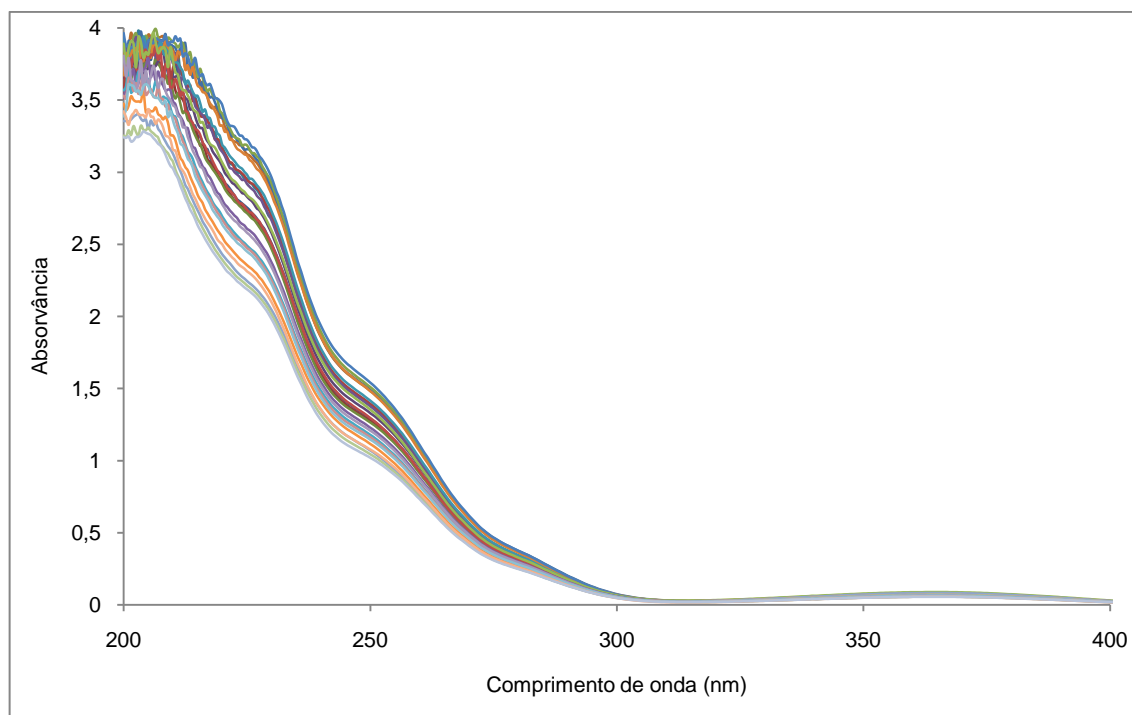


FIGURA 22 - Espectros na região do ultravioleta das *soluções amostra F1 a F25* do conjunto de calibração para quantificação dos fármacos no medicamento comercial, apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (Concentração nominal dos fármacos: 40 $\mu\text{g/mL}$ de losartano potássico e 5,556 $\mu\text{g/mL}$ de besilato de anlodipino).

5.4 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

5.4.1 Escolha do conjunto de validação externa para PLS2 para as apresentações comercial 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico e 5 mg de lanlodipino + 50 mg de losartano potássico

Inicialmente, os dados espectrais do conjunto de 25 amostras do modelo de calibração multivariada foram submetidos a uma rotina de Análise de Componentes Principais (PCA), para a definição do conjunto de validação. O programa gerou então, o gráfico de *scores*, representado na FIGURA 23 (apresentação comercial 2,5 + 50 mg) e na FIGURA 24 (apresentação comercial 5 + 50 mg). No nosso caso, o ponto central corresponde a *solução amostra C1* ou *solução amostra F1*, que corresponde às concentrações nominais de 40 $\mu\text{g/mL}$ de losartano potássico (*soluções amostra C1 e F1*) e de 2,778 $\mu\text{g/mL}$ (*solução amostra C1*) ou de

5,556 $\mu\text{g/mL}$ (*solução amostra F1*) de besilato de anlodipino (dependendo da concentração de anlodipino na amostra, 2,5 ou 5 mg, respectivamente). Para a escolha do conjunto de validação externa, foram utilizadas as análise por PCA. Os conjuntos escolhidos estão representados na FIGURA 23 e na FIGURA 24.

As concentrações dos conjuntos de validação externa escolhidos estão demonstradas no QUADRO 4 e no QUADRO 5.

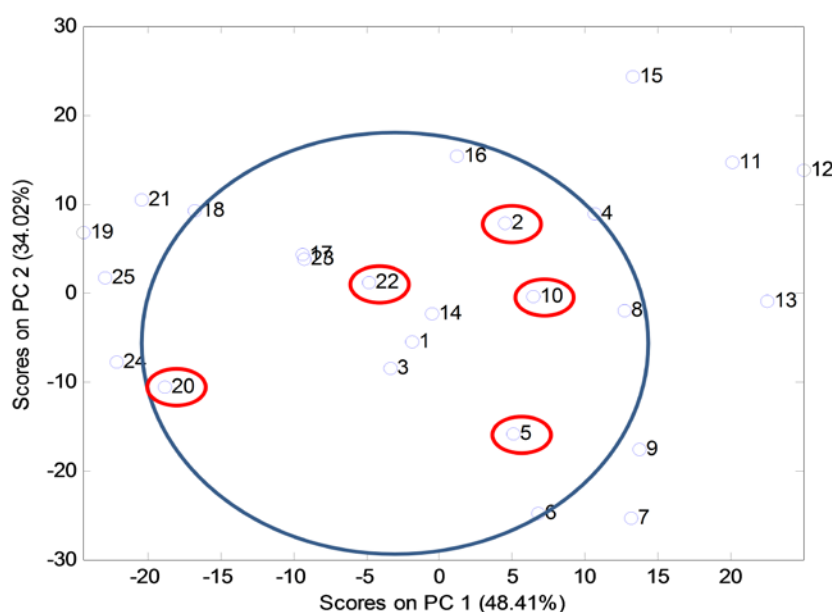


FIGURA 23 - Definição do conjunto de validação externa através da rotina de PCA (amostras nos círculos menores) para o medicamento comercial, na apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.

Amostra	Concentração de Losartano potássico ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de Besilato de anlodipino ($\mu\text{g/mL}$)
C2	41,686	2,714
C5	47,641	2,856
C10	39,701	3,142
C20	33,746	3,285
C22	35,731	2,571

*Valores de concentração corrigidos pela quantificação por CLAE.

QUADRO 4 - Concentrações das soluções amostra C que compõem o conjunto de validação externa do modelo multivariado por PLS2 para a apresentação comercial 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.

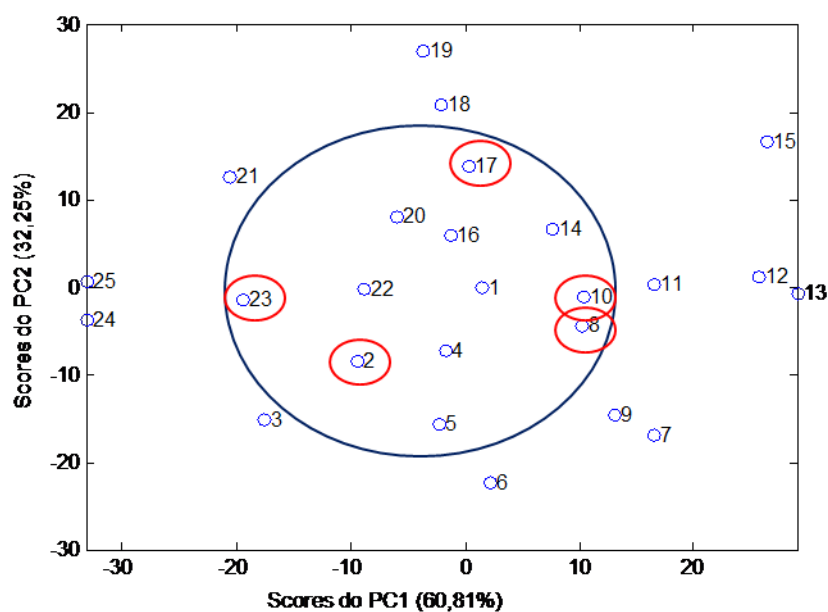


FIGURA 24 - Definição do conjunto de validação externa através da rotina de PCA (amostras nos círculos menores) para o medicamento comercial, na apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.

Amostra	Concentração de Losartano potássico ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de Besilato de anlodipino ($\mu\text{g/mL}$)
F2	41,108	5,073
F8	45,219	5,637
F10	43,164	5,919
F17	36,997	6,200
F23	36,997	5,073

*Valores de concentração corrigidos pela quantificação por CLAE.

QUADRO 5 - Concentrações das soluções amostra F que compõem o conjunto de validação externa do modelo multivariado por PLS2 para a apresentação comercial 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.

5.4.2 Montagem e escolha do melhor modelo de calibração multivariada

5.4.2.1 Quantificação dos fármacos besilato de anlodipino e losartano potássico no medicamento comercial, apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico

Vários modelos de calibração multivariada foram montados, até a escolha do modelo que foi considerado o mais apropriado.

Inicialmente esses modelos foram montados utilizando-se vinte amostras para calibração e cinco amostras para validação externa e modo PLS2, ou seja, as quantificações foram feitas a partir de uma única matriz de dados de concentração para os dois fármacos.

Os dados espectrais utilizados foram obtidos pela varredura entre 200 e 400 nm, com intervalos de 0,5 nm. Dessa forma, inicialmente, foram obtidos 401 dados de absorvância (variáveis) para cada amostra submetida à varredura.

Para a quantificação simultânea, as primeiras três faixas espectrais analisadas foram: de 200 a 400 nm; de 230 a 400 nm (visando eliminar a faixa com ruídos que vai mais ou menos até 230 nm); e de 230 a 280 nm acrescido de 335 a 385 nm (visando avaliar os dados onde se verificaram os picos mais característicos dos fármacos na região do ultravioleta).

Outro fator considerado para a montagem dos modelos foi o pré-processamento. Alguns pré-processamentos foram testados, utilizando o programa MATLAB 7.0.1. Nesses testes, foram utilizados os pré-processamentos de dados autoescalados e de dados centrados na média. Também foram realizados testes sem pré-processamentos. Na maioria dos casos, esses pré-processamentos se mostraram bastante adequados em relação à validação externa.

Também foram realizados pré-processamentos do tipo derivadas (1ª, 2ª e 3ª ordem) e normalização, mas esses pré-processamentos não apresentaram resultados satisfatórios com relação à validação externa. Alguns exemplos podem ser vistos na TABELA 13, que relaciona os resultados de quantificação a partir da validação externa para os pré-processamentos testados, nos modelos abrangendo

comprimento de onda entre 230-400 nm, faixa de comprimento de onda que apresentou também os melhores resultados de quantificação.

Utilizando o modelo de calibração multivariada desenvolvido empregando cada tipo de pré-processamento, os dados espectrais das cinco amostras do conjunto de validação externa foram submetidos à rotina no MATLAB, gerando valores de quantificação para cada amostra. Na TABELA 13 estão demonstrados os valores percentuais de quantificação, sendo estes a média das cinco amostras, com seus respectivos desvios padrão. Para fins de aceitação como um modelo adequado, foi definido que seriam considerados valores com variação percentual na quantificação, inferior a 2% (entre 98 e 102% de quantificação).

TABELA 13 - Percentuais de quantificação na validação externa para modelos de calibração multivariada com diferentes pré-processamentos e quatro variáveis latentes

Pré-processamento	% de quantificação obtidos na validação interna \pm DPR*	
	Losartano potássico	Besilato de anlodipino
Autoescalado	99,72 \pm 0,41	99,87 \pm 0,32
Centrado na média	100,08 \pm 1,13	99,69 \pm 3,86
Sem pré-processamento	100,18 \pm 1,03	101,26 \pm 4,53
1ª Derivada	100,65 \pm 0,88	94,22 \pm 2,59
2ª Derivada	101,10 \pm 0,81	97,57 \pm 2,55
3ª Derivada	101,69 \pm 1,44	103,43 \pm 9,43
Normalização	101,26 \pm 3,45	95,86 \pm 3,35

*DPR: Desvio padrão relativo (conjunto de validação externa: n = 5 amostras).

Partindo dos dados de validação externa, o pré-processamento escolhido para o modelo foi o autoescalado, que consiste basicamente em diminuir cada valor de absorvância do valor médio do respectivo comprimento de onda e depois dividir pelo desvio padrão. Esse pré-processamento é utilizado para minimizar grandes diferenças espectrais, como ocorre nesse caso, onde a absorvância da banda característica do anlodipino é muito menor que aquela observada na banda característica do losartano.

A rotina de validação cruzada do tipo *leave one out* foi utilizada para a definição do menor número de variáveis latentes (VL) a ser escolhido para o modelo de calibração. É de conhecimento que o uso de um menor número de VL confere robustez ao modelo. Além disso, um maior número de variáveis latentes pode

causar certos ajustes no modelo, que, com o aparecimento de pequenas variações experimentais, pode provocar perda significativa na sua capacidade de previsão.

Dessa forma, escolheu-se o número de variáveis latentes baseando-se nos erros de previsão das etapas de calibração (RMSEC) e de validação (RMSECV) e no coeficiente de correlação (r^2).

A TABELA 14 e a TABELA 15 trazem os dados referentes à variância capturada pelo modelo e aos erros de previsão.

TABELA 14 - Percentuais de variância capturados pelo modelo multivariado PLS2 para a apresentação comercial contendo 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico

Nº de VL	% de variância capturados pelo modelo PLS2			
	Matriz de espectros		Matriz de concentração	
	Cada VL	Total	Cada VL	Total
1	48,18	48,18	48,47	48,47
2	41,90	90,08	40,31	88,78
3	9,09	99,17	10,56	99,33
4	0,18	99,35	0,48	99,81
5	0,07	99,42	0,13	99,94
6	0,05	99,46	0,03	99,98
7	0,05	99,52	0,02	99,99
8	0,05	99,56	0,00	100,00

VL = variáveis latentes

TABELA 15 - Erros de previsão para o modelo PLS2 da apresentação comercial 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico

Nº de VL	r^2		RMSEC		RMSECV	
	Losartano Potássico	Besilato de Anlodipino	Losartano Potássico	Besilato de Anlodipino	Losartano Potássico	Besilato de Anlodipino
1	0,972	0,140	1,246	0,394	2,620	0,495
2	0,993	0,889	0,673	0,182	0,828	0,224
3	1,000	0,994	0,161	0,045	0,200	0,059
4	1,000	0,999	0,150	0,022	0,205	0,041
5	1,000	1,000	0,150	0,008	0,208	0,040
6	1,000	1,000	0,058	0,007	0,247	0,040
7	1,000	1,000	0,045	0,003	0,247	0,040
8	1,000	1,000	0,025	0,002	0,240	0,039

VL = variáveis latentes

A partir da observação da TABELA 15, foi possível visualizar que a partir de oito variáveis latentes, o erro está bastante diminuído. Buscando um modelo mais robusto, com um menor número de variáveis latentes, os modelos foram montados utilizando duas, três e quatro variáveis latentes, onde se observa uma constância no valor de r^2 , além de verificar a proximidade desse valor à 1,0, valor tido como ótimo para esse parâmetro. Já observando a TABELA 14, é possível verificar que com quatro variáveis latentes, o valor de percentual de variância capturada não se altera significativamente. Como o modelo com quatro variáveis latentes apresentou dados da validação externa considerados adequados, com r^2 próximo a 1,0, baixo erro de previsão e percentual de variância baixo, este foi o modelo escolhido.

Ainda um importante ponto a ser considerado é a ausência de anomalias. Os valores de resíduo de Student, com grau de confiança de 95%, devem estar entre $\pm 2,5$. A *leverage*, que verifica a distância entre as amostras e seu centróide, deve ser calculada pela equação $3VL/n$.

No primeiro modelo, com vinte amostras de calibração, a *solução amostra* C4 apresentou anomalia para um ou outro parâmetro avaliado, dependendo do pré-processamento utilizado nos dados. Essa amostra foi retirada e se seguiram novos testes.

Com o número de 19 amostras para o modelo de calibração, nenhuma amostra apresentou valores acima de +2,5 ou abaixo de -2,5 para resíduo de Student e, em relação à *leverage*, onde temos um valor de 0,63 nesse modelo, observamos que nenhuma amostra se apresentou anômala.

A FIGURA 24 expressa graficamente estes parâmetros, em que o gráfico A representa os resultados obtidos para o losartano potássico e o gráfico B, para o besilato de anlodipino, derivados do modelo PLS2.

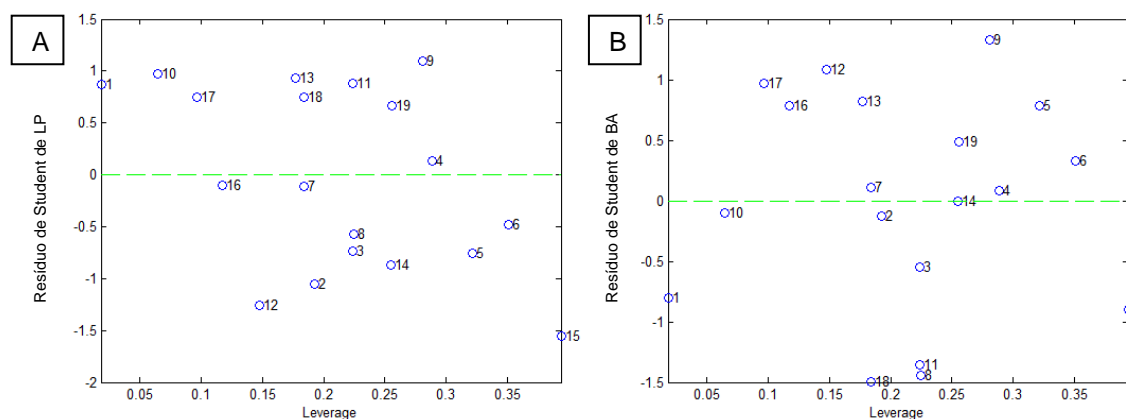


FIGURA 25 - Gráfico de resíduo de Student X leverage para modelo multivariado do tipo PLS2, para os fármacos na apresentação comercial contendo 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (LP: losartano potássico (A); BA: besilato de anlodipino (B)).

Os dados de quantificação da validação externa deste modelo podem ser visualizados na TABELA 16.

TABELA 16 - Percentuais de quantificação do losartano potássico e do besilato de anlodipino obtidos na validação externa para o modelo multivariado PLS2 escolhido, do medicamento comercial na apresentação 2,5 + 50 mg

	Losartano potássico	Besilato de anlodipino
Média de quantificação \pm DPR*	99,72 \pm 0,41	99,87 \pm 0,38
Coeficiente de variação	0,40	0,32

*DPR: Desvio padrão relativo.

Com o modelo de calibração multivariada desenvolvido e após verificar-se que na validação externa este apresentou resultados de quantificação próximos a 100%, foi iniciada a validação com amostras externas ao modelo. Nesta etapa foram avaliados os parâmetros repetitividade e robustez frente ao pH e temperatura. Os parâmetros avaliados, bem como os resultados de quantificação obtidos estão demonstrados na TABELA 17.

TABELA 17 - Resultados percentuais de quantificação na validação do modelo multivariado PLS2 do medicamento comercial na apresentação 2,5 + 50 mg

	% quantificação para losartano potássico \pm DPR*	% quantificação para besilato de anlodipino \pm DPR*
Repetitividade	93,18 \pm 0,37	101,05 \pm 0,50
Robustez - pH 2,5	96,46 \pm 0,33	94,01 \pm 1,01
**Robustez - pH 3,0	93,42 \pm 0,30	101,13 \pm 0,76
Robustez - pH 3,5	92,07 \pm 1,26	104,58 \pm 0,81
**Robustez - temperatura ambiente	92,93 \pm 0,25	100,96 \pm 0,11
Robustez - temperatura resfriada	93,28 \pm 0,11	97,66 \pm 0,69
Robustez - temperatura aquecida	94,00 \pm 0,24	97,59 \pm 1,11

*DPR: Desvio padrão relativo.

** Mesma condição do modelo.

Conforme pode ser visualizado na TABELA 17, os resultados de quantificação foram de cerca de somente 93% para o losartano potássico e próximos a 101% para o besilato de anlodipino. Esse modelo foi descartado por não se mostrar eficiente para um dos fármacos. Partindo desses dados, foi possível verificar a impossibilidade de validar esse modelo, portanto os demais parâmetros não foram avaliados.

Com base nestes resultados, os dados já coletados foram utilizados para montar modelos multivariados PLS1, ou seja, a matriz de concentração que era usada foi separada em duas, uma para cada fármaco. Mesmo com a utilização de dois modelos distintos, as análises continuaram sendo realizadas empregando uma etapa única de preparo e leitura em espectrofotômetro. Assim, esse desenvolvimento foi baseado em faixas espectrais mais adequadas para cada um dos fármacos. Com isso, uma etapa a mais foi adicionada ao processo de montagem de modelo multivariado, mas somente no processamento pelo programa estatístico e não na preparação das amostras.

Três faixas espectrais foram testadas para cada fármaco, sendo uma com todos os dados de absorvância, ou seja, de 200 a 400 nm para os dois fármacos, um modelo com dados de absorvância entre 230-400 nm também para os dois fármacos, excluindo a área de maior ruído; e de forma separada, a partir da análise dos dados do espectro, com os dados espectrais entre 230 a 310 nm para a

quantificação do losartano potássico e entre 320 a 400 nm para a quantificação do besilato de anlodipino.

Os modelos que apresentaram melhores resultados frente às amostras de validação externa foram os que utilizaram dados espectrais distintos para cada um dos fármacos, ou seja, 230 a 310 nm para a quantificação do losartano potássico, e de 320 a 400 nm para a quantificação do besilato de anlodipino. Esta foi então a estratégia escolhida para ser utilizada na quantificação dos fármacos no medicamento comercial, na apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.

Assim, um novo conjunto de validação externa foi obtido a partir de uma rotina de Análise de Componentes Principais, conforme a FIGURA 26. Para a escolha desse conjunto de validação, a matriz de dados utilizada foi a completa, com dados de absorvância entre 200 e 400 nm, sendo o mesmo conjunto de validação externa utilizado para os dois fármacos. Os dados de concentração das amostras do conjunto de validação externa estão representados no QUADRO 6.

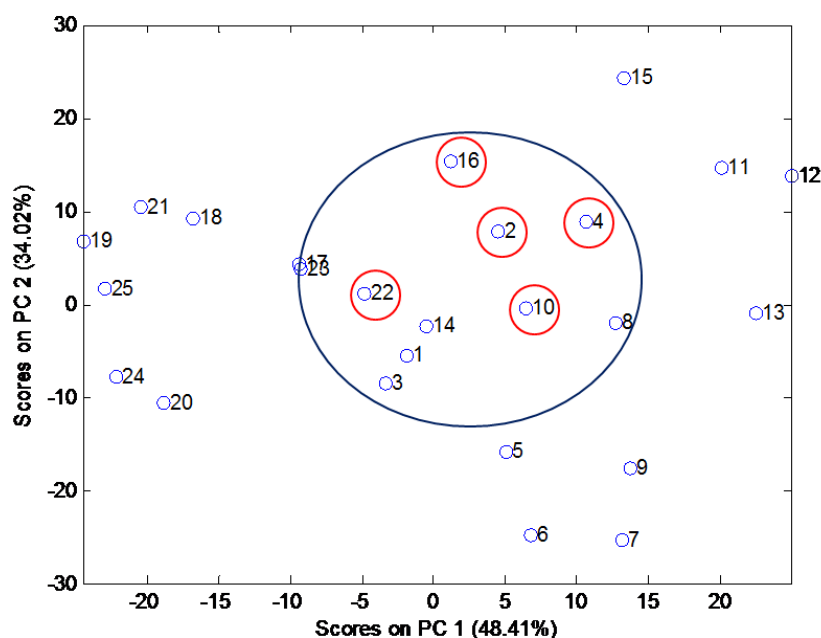


FIGURA 26 - Definição do conjunto de validação externa através da rotina de PCA (amostras nos círculos menores), para a amostra do medicamento comercial, na apresentação 2,5 + 50 mg, para quantificação por PLS1 do losartano potássico e do besilato de anlodipino.

Amostra	Concentração de Losartano potássico ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de Besilato de anlodipino ($\mu\text{g/mL}$)
C2	39,701	2,571
C4	41,686	2,714
C10	41,686	2,999
C16	37,716	2,999
C22	37,716	2,714

*Valores de concentração corrigidos pela quantificação por CLAE.

QUADRO 6 - Concentrações das soluções amostra C que compõem o conjunto de validação externa dos modelos multivariados por PLS1 para a apresentação comercial 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.

Para a apresentação farmacêutica em questão, o pré-processamento centrado na média foi o que apresentou os melhores resultados de quantificação, para os dois fármacos. Apesar de na quantificação simultânea, o pré-processamento autoescalado fornecer resultados melhores para o besilato de anlodipino, como dito anteriormente, esse pré-processamento é muito utilizado para minimizar grandes diferenças espectrais, o que não é mais observado nesse modelo, uma vez que foi utilizada uma faixa espectral com dados mais específicos para cada fármaco nos modelos.

A escolha do número de VL se deu da mesma forma, pelo percentual de variância capturado pelo modelo e por RMSEC e RMSECV, conforme o observado na TABELA 18 e na TABELA 19.

Pode-se verificar que para o besilato de anlodipino, três variáveis latentes já permitem um erro de previsão bastante pequeno, enquanto o mesmo acontece com duas variáveis latentes para o losartano potássico.

Em relação às anomalias, os modelos montados com vinte amostras de calibração, apresentaram ausência de anomalias, tanto para o resíduo de Student quanto para a *leverage*, sendo esta com valor de 0,45, para ambos os modelos. Esses dados podem ser visualizados na FIGURA 27, onde o gráfico A representa os resultados obtidos para o losartano potássico e o gráfico B, para o besilato de anlodipino, derivados dos modelos PLS1.

TABELA 18 - Percentual de variância capturada pelos modelos multivariados PLS1 para a apresentação comercial contendo 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico

Nº de VL	% de variância capturados pelos modelos PLS1							
	Losartano potássico				Besilato de anlodipino			
	Matriz de espectros		Matriz de concentração		Matriz de espectros		Matriz de concentração	
	Cada VL	Total	Cada VL	Total	Cada VL	Total	Cada VL	Total
1	99,97	99,97	99,54	99,54	95,72	95,72	82,24	82,24
2	0,02	99,99	0,27	99,81	3,27	98,99	17,10	99,35
3	0,01	100,00	0,10	99,91	0,22	99,21	0,40	99,75
4	0,00	100,00	0,05	99,96	0,08	99,29	0,22	99,96
5	0,00	100,00	0,02	99,97	0,06	99,35	0,03	99,99
6	0,00	100,00	0,01	99,99	0,06	99,42	0,01	100,00

TABELA 19 - Erros de previsão para os modelos PLS1 da apresentação comercial 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico

Nº de VL's	Losartano potássico			Besilato de Anlodipino		
	r^2	RMSEC	RMSECV	r^2	RMSEC	RMSECV
1	0,998	0,376	0,415	0,907	0,166	0,184
2	0,999	0,280	0,291	0,997	0,032	0,038
3	1,000	0,167	0,224	0,999	0,020	0,033
4	1,000	0,117	0,193	1,000	0,008	0,032
5	1,000	0,088	0,177	1,000	0,003	0,032
6	1,000	0,067	0,164	1,000	0,001	0,032

Assim, para o losartano potássico, os melhores resultados foram para o modelo com duas variáveis latentes, com dados espectrais entre 230-310 nm, com pré-processamento centrado na média. Com este modelo de calibração multivariada, a quantificação deste fármaco frente à validação interna foi de 100,04% \pm 0,28. Para o besilato de anlodipino, o modelo multivariado com melhores resultados frente à validação interna foi com três variáveis latentes, dados espectrais entre 320-400 nm e pré-processamento centrado na média. O resultado da quantificação na validação interna para o besilato de anlodipino foi de 100,25% \pm 0,73.

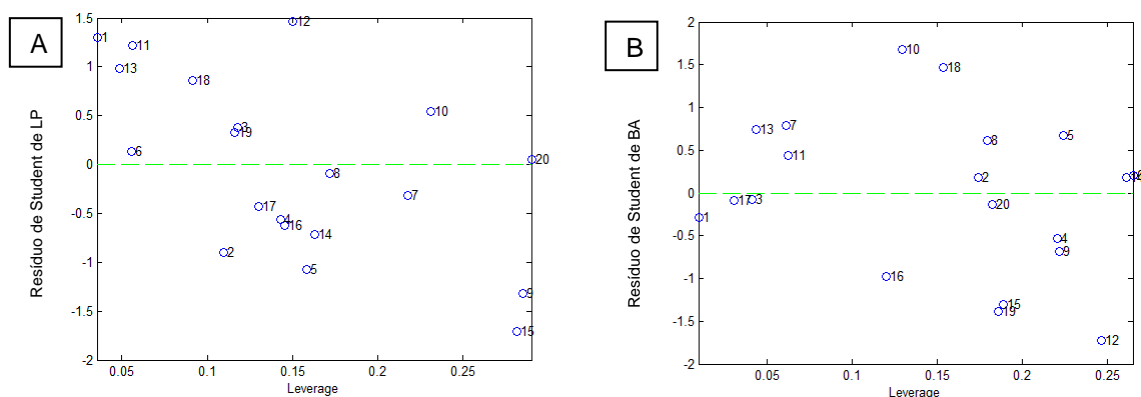


FIGURA 27 - Gráfico de resíduo de Student X leverage para modelos multivariados do tipo PLS1, para os fármacos na apresentação contendo 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (LP: losartano potássico (A); BA: besilato de anlodipino (B)).

Na validação utilizando amostras externas ao modelo, os resultados de quantificação se apresentaram em conformidade com a legislação para o besilato de anlodipino, com valores de quantificação em torno de 101%, mas para o losartano potássico, os valores de quantificação ficaram em torno de 95%, conforme o demonstrado na TABELA 20.

TABELA 20 - Resultados percentuais de quantificação na validação do modelo multivariado PLS1 do medicamento comercial na apresentação 2,5 + 50 mg

	% quantificação para losartano potássico \pm DPR*	% quantificação besilato de anlodipino \pm DPR*
Repetitividade	93,20 \pm 0,41	101,37 \pm 0,50
Robustez - pH 2,5	94,03 \pm 0,26	97,46 \pm 1,41
**Robustez - pH 3,0	95,40 \pm 0,41	101,56 \pm 0,63
Robustez - pH 3,5	99,48 \pm 1,24	100,50 \pm 0,74
**Robustez - temperatura ambiente	94,20 \pm 0,12	101,19 \pm 0,36
Robustez - temperatura resfriada	96,01 \pm 0,24	98,12 \pm 1,18
Robustez - temperatura aquecida	96,11 \pm 0,30	98,11 \pm 1,43
**Exatidão – concentração nominal	95,40 \pm 0,41	101,56 \pm 0,63
Exatidão por adição de padrão - acrécimo de 10% de padrões	109,67 \pm 0,68	114,44 \pm 2,27
Exatidão por adição de padrão - acrécimo de 20% de padrões	118,94 \pm 0,32	122,02 \pm 0,99

*DPR: Desvio padrão.

** Mesma condição do modelo.

Esse resultado foi inesperado, uma vez que os valores de validação externa foram bastante promissores, quando comparado ao modelo PLS2 desenvolvido. E

partindo desses valores, os parâmetros precisão intermediária e estabilidade não foram avaliados para esses modelos.

5.4.2.2 Quantificação dos fármacos besilato de anlodipino e losartano potássico no medicamento comercial, apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico

Inicialmente, os dados espectrais obtidos das *soluções amostra F1 a F25* para quantificação dos fármacos na apresentação comercial contendo 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico foram tratados de forma semelhante àqueles aplicados ao conjunto de calibração relativo ao medicamento comercial na apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, ou seja, o modelo foi desenvolvido primeiramente utilizando PLS2.

O modelo com pré-processamento autoescalado, com os dados espectrais entre os comprimentos de onda de 230-400 nm, também foi o modelo com melhores resultados frente à validação externa. Nesse modelo, a quantificação foi de 100,25% \pm 0,43 para o losartano potássico e de 100,06% \pm 0,71 para o besilato de anlodipino.

Mais uma vez, foram ousados os dados de variância capturada pelo modelo, assim como os dados de erro de previsão (RMSEC e RMSECV), para a escolha do melhor número de variáveis latentes (TABELA 21 e TABELA 22). De acordo com esses dados, é possível verificar que três variáveis latentes já apresentam valor de r^2 próximos a 1, com pequenos erros de previsão, além de não apresentarem um ganho significativo no total de variância capturada pelo modelo, sendo esse o número de variáveis latentes escolhido.

TABELA 21 - Percentual de variância capturada pelo modelo multivariado PLS2 para a apresentação comercial contendo 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico

Nº de VL	% de variância capturado pelo modelo PLS2			
	Matriz de espectros		Matriz de concentração	
	Cada VL	Total	Cada VL	Total
1	51,28	51,28	55,80	55,80
2	45,87	97,15	40,61	96,42
3	2,22	99,37	3,40	99,82
4	0,34	99,71	0,11	99,93
5	0,03	99,74	0,04	99,96
6	0,03	99,76	0,03	99,99
7	0,03	99,79	0,01	100,00

TABELA 22 - Erros de previsão para o modelo PLS2 da apresentação comercial 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico

Nº de VL's	r^2		RMSEC		RMSECV	
	Losartano Potássico	Besilato de Anlodipino	Losartano Potássico	Besilato de Anlodipino	Losartano Potássico	Besilato de Anlodipino
1	0,732	0,761	3,657	0,477	5,050	0,591
2	0,997	0,966	0,396	0,189	0,477	0,228
3	0,999	0,999	0,260	0,026	0,318	0,035
4	1,000	1,000	0,134	0,022	0,180	0,028
5	1,000	1,000	0,129	0,009	0,192	0,030
6	1,000	1,000	0,044	0,008	0,229	0,029
7	1,000	1,000	0,043	0,004	0,228	0,028

Como havia acontecido no modelo para o medicamento comercial, na apresentação 2,5 + 50 mg, no desenvolvimento do modelo para o medicamento comercial, na apresentação 5 + 50 mg, também foi detectada uma anomalia, com o uso das 20 amostras. Essa anomalia se referia à *solução amostra F25* do modelo, um ponto extremo. Essa amostra apresentou valores de resíduo de Student superiores a 2,5, sendo retirada do modelo. O modelo com dezenove amostras (*leverage* = 0,63) não apresentou anomalias, como observado na FIGURA 28, onde o gráfico A representa os resultados obtidos para o losartano potássico e o gráfico B, para o besilato de anlodipino, derivados do modelo PLS2.

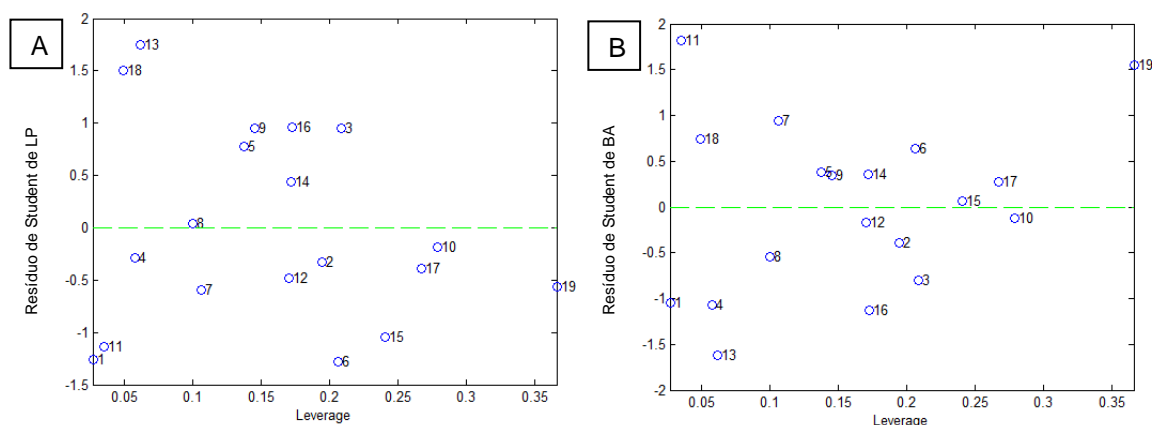


FIGURA 28 - Gráfico de resíduo de Student X *leverage* para modelo multivariado do tipo PLS2, para os fármacos na apresentação contendo 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (LP: losartano potássico (A); BA: besilato de anlodipino (B)).

Com o modelo de calibração multivariada desenvolvido e após verificar-se que na validação externa este apresentou resultados de quantificação próximos a 100%, foi iniciada a validação com amostras externas ao modelo. Nesta etapa foram avaliados os parâmetros repetitividade, robustez frente ao pH e temperatura e exatidão. Os resultados de quantificação, assim como para a apresentação comercial 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, também não apresentaram resultados satisfatórios segundo a legislação vigente, especialmente para o losartano potássico, conforme o observado na TABELA 23.

Embora esses dados sejam considerados conformes para a precisão (variação de $\pm 5\%$), não foram para a exatidão (variação de $\pm 2\%$ para losartano potássico e de $\pm 3\%$ para besilato de anlodipino). Também em função desses dados obtidos, os parâmetros precisão intermediária e estabilidade não foram avaliados.

Esses resultados levaram ao desenvolvimento de novos modelos de calibração, pois quando avaliados em um único modelo, os dois fármacos responderam de formas diferentes aos diferentes pré-processamentos. Com isso, optou-se por desenvolver modelos multivariados do tipo PLS1, estratégia que também havia sido utilizada para o medicamento comercial, na a apresentação farmacêutica 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.

TABELA 23 - Resultados da validação do modelo multivariado do tipo PLS2 do medicamento comercial, na apresentação 5 + 50 mg

	% quantificação para losartano potássico \pm DPR*	% quantificação besilato de anlodipino \pm DPR*
Repetitividade	96,57 \pm 0,38	101,66 \pm 0,35
Robustez - pH 2,5	96,03 \pm 0,44	96,57 \pm 0,49
**Robustez - pH 3,0	96,47 \pm 0,33	101,84 \pm 0,12
Robustez - pH 3,5	92,19 \pm 0,24	107,26 \pm 0,40
**Robustez - temperatura ambiente	96,66 \pm 0,46	101,48 \pm 0,44
Robustez - temperatura resfriada	98,88 \pm 0,73	101,41 \pm 0,84
Robustez - temperatura aquecida	100,53 \pm 2,45	108,53 \pm 2,97
**Exatidão - concentração nominal	96,66 \pm 0,46	101,48 \pm 0,44
Exatidão por adição de padrão - acrécimo de 10% de padrões	109,88 \pm 1,38	113,41 \pm 1,90
Exatidão por adição de padrão - acrécimo de 20% de padrões	121,42 \pm 2,54	125,88 \pm 3,00

*DPR: Desvio padrão relativo.

** Mesma condição do modelo.

Escolheu-se as mesmas faixas espectrais que foram utilizadas nos modelos desenvolvidos para a apresentação comercial 2,5 + 50 mg, ou seja, de 230 a 310 nm para losartano potássico e de 320 a 400 nm para besilato de anlodipino.

O conjunto de validação foi obtido a partir de uma rotina de Análise de Componentes Principais, conforme a FIGURA 29. Para a escolha desse conjunto de validação, a matriz de dados utilizada foi a completa, com dados de absorvância entre 200 e 400 nm, sendo o mesmo conjunto de validação utilizado para os dois fármacos. Os dados de concentração das amostras do conjunto de validação externa estão representados no QUADRO 7.

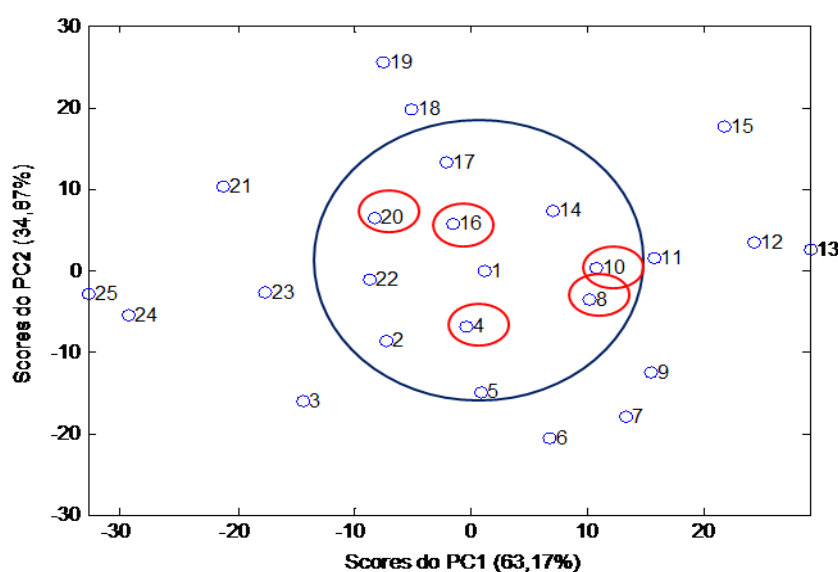


FIGURA 29 - Definição do conjunto de validação externa através da rotina de PCA (amostras nos círculos menores), para a amostra do medicamento comercial, na apresentação 5 + 50 mg, para quantificação por PLS1 do losartano potássico e do besilato de anlodipino.

Amostra	Concentração de Losartano potássico ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de Besilato de anlodipino ($\mu\text{g/mL}$)
F4	42,004	5,282
F8	43,999	5,560
F10	42,004	5,839
F16	38,012	5,839
F20	38,017	5,560

*Valores de concentração corrigidos pela quantificação por CLAE.

QUADRO 7 - Concentrações das soluções amostra F que compõem o conjunto de validação externa dos modelos multivariados por PLS1 para a apresentação comercial 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico

Novamente os modelos que utilizaram o pré-processamento centrado na média forneceram os melhores resultados frente à validação externa.

Quanto ao número de variáveis latentes, dessa vez, foi conseguido um mesmo número para os dois fármacos: duas variáveis latentes, conforme mostrado na TABELA 24 e na TABELA 25. Nesses modelos, o erro de previsão já se apresenta bastante diminuído com duas variáveis latentes. Além disso, o percentual de variância capturada pelo modelo não sofre grandes alterações a partir desse número de variáveis latentes, o que justifica a escolha desse número de variáveis latentes.

TABELA 24 - Percentual de variância capturada pelos modelos multivariados PLS1 para a apresentação comercial contendo 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico

Nº de VL	% de variância capturados pelos modelos PLS1							
	Losartano potássico				Besilato de anlodipino			
	Matriz de espectros		Matriz de concentração		Matriz de espectros		Matriz de concentração	
	Cada VL	Total	Cada VL	Total	Cada VL	Total	Cada VL	Total
1	99,94	99,94	98,29	98,29	99,54	99,54	95,92	95,92
2	0,05	99,99	1,21	99,50	0,30	99,84	3,29	99,21
3	0,00	99,99	0,14	99,64	0,01	99,85	0,72	99,93
4	0,00	100,00	0,08	99,72	0,02	99,87	0,05	99,98
5	0,00	100,00	0,12	99,84	0,02	99,89	0,02	100,00
6	0,00	100,00	0,12	99,96	0,01	99,90	0,00	100,00
7	0,00	100,00	0,03	99,99	0,01	99,90	0,00	100,00
8	0,00	100,00	0,01	100,00	0,01	99,91	0,00	100,00

TABELA 25 - Erros de previsão para os modelos PLS1 da apresentação comercial 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico

Nº de VL's	Losartano potássico			Besilato de Anlodipino		
	r^2	RMSEC	RMSECV	r^2	RMSEC	RMSECV
1	0,991	0,712	0,784	0,979	0,157	0,178
2	0,998	0,383	0,476	0,996	0,069	0,092
3	0,998	0,326	0,508	1,000	0,021	0,081
4	0,999	0,289	0,546	1,000	0,010	0,075
5	0,999	0,219	0,564	1,000	0,004	0,077
6	1,000	0,111	0,651	1,000	0,001	0,077
7	1,000	0,059	0,628	1,000	0,0003	0,076
8	1,000	0,034	0,606	1,000	0,0001	0,076

Já em relação às anomalias, podemos verificar na FIGURA 30 que para o besilato de anlodipino há uma anomalia de *leverage* (aqui com valor máximo de 0,3), a amostra número 6 do modelo, correspondente à *solução amostra F7*, para o fármaco besilato de anlodipino. Na FIGURA 30, o gráfico A representa os resultados obtidos para o losartano potássico e o gráfico B, para o besilato de anlodipino, derivados dos modelos PLS1.

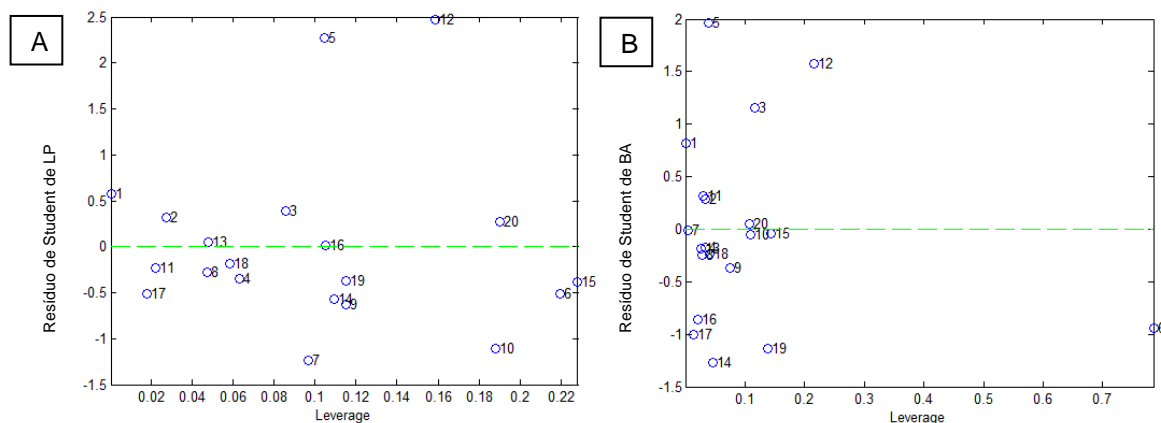


FIGURA 30 - Gráfico de resíduo de Student X *leverage* para modelos multivariados do tipo PLS1, para os fármacos na apresentação contendo 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico (LP: losartano potássico (A); BA: besilato de anlodipino (B)).

Sabe-se que as anomalias de *leverage* podem resultar em um aumento do número da variáveis latentes necessárias para explicar o modelo. Entretanto, pode-se dizer que essa amostra não afetou de forma significativa o modelo, uma vez que duas variáveis latentes foram suficientes para explicá-lo. Neste caso, pode-se ter uma pequena perda na previsão, mas optou-se pela escolha desse modelo em função das quantificações frente à validação externa, que ainda assim, apresentaram valores mais adequados e com menor desvio padrão do que os modelos com maior número de variáveis latentes ou outros pré-processamentos.

Nos modelos desenvolvidos, os melhores resultados foram observados nos modelos com duas variáveis latentes e dados centrados na média para os ambos os fármacos. Os dados espectrais utilizados no modelo de calibração para quantificação do losartano potássico foram entre 230 e 310 nm, apresentando resultados de quantificação de $100,10\% \pm 1,10$ frente à validação externa. Já para o besilato de anlodipino, os dados espectrais compreenderam valores de absorvância entre 320 e 400 nm, com resultados de quantificação de $100,04\% \pm 2,02$.

Para a validação, os modelos PLS1, da amostra do medicamento comercial na apresentação de 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, apresentaram resultados considerados conforme, segundo a legislação vigente. Os ensaios realizados serão discutidos em seguida.

5.4.2.2.1 Validação dos modelos dos fármacos besilato de anlodipino e losartano potássico no medicamento comercial, na apresentação de 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, para modelos PLS1

a) Precisão - Repetitividade

As amostras foram preparadas em triplicata tendo como base a concentração de 40 µg/mL de losartano potássico e 5,556 µg/mL de besilato de anlodipino.

Algumas instituições nacionais e internacionais, como o ICH (2005), o Labcompliance (2010), a ANVISA (2003) e o INMETRO (2010), fazem menção aos valores que devem ser considerados para precisão. Outros, apenas citam a necessidade desta avaliação. Neste trabalho, aceitaremos como precisos valores de quantificação com coeficiente de variação inferior a 5%.

As amostras foram avaliadas em dois períodos de um mesmo dia, por um mesmo analista, e os dados são expressos na TABELA 26.

TABELA 26 - Resultados dos valores médios de previsão, com respectivo desvio padrão relativo, da quantificação pelos modelos multivariados PLS1 para a avaliação da precisão - repetitividade

		Losartano potássico	Besilato de anlodipino
Período 1	Média teórica (µg/mL)	40,1594 ± 0,23	5,5770 ± 0,09
	Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	41,7457 ± 0,39	5,5943 ± 0,11
	% quantificado pelo modelo	103,95 ± 0,96	100,31 ± 1,98
Período 2	Média teórica (µg/mL)	40,1601 ± 0,15	5,6048 ± 0,04
	Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	39,9626 ± 0,17	5,5942 ± 0,02
	% quantificado pelo modelo	99,51 ± 0,41	99,81 ± 0,42
Entre períodos	Média teórica (µg/mL)	40,1598 ± 0,18	5,5909 ± 0,06
	Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	40,8546 ± 1,26	5,5943 ± 0,02
	% quantificado pelo modelo	101,73 ± 3,14	100,06 ± 0,35
	Coeficiente de variação (%)	3,09	0,35

Conforme os resultados obtidos, pôde-se concluir que os modelos multivariados se apresentaram precisos na avaliação da repetitividade, pois para os dois fármacos os valores de coeficiente de variação foram inferiores a 5%, conforme exigido pela legislação.

b) Precisão - Precisão intermediária

Os mesmos critérios foram considerados para a avaliação de precisão intermediária, que foi realizada por dois analistas, em dias diferentes. Para a realização desta análise, *soluções de validação D* foram preparadas em diferentes dias, por dois analistas diferentes. As amostras foram feitas em triplicata e os dados obtidos estão representados na TABELA 27.

TABELA 27 - Resultados dos valores médios de previsão, com respectivo desvio padrão relativo, da quantificação pelos modelos multivariados PLS1 para a avaliação da precisão - precisão intermediária

		Losartano potássico	Besilato de anlodipino
Analista 1	Média teórica ($\mu\text{g/mL}$)	$40,1587 \pm 0,21$	$5,5943 \pm 0,09$
	Média quantificada pelo modelo ($\mu\text{g/mL}$)	$41,5402 \pm 0,25$	$5,5999 \pm 0,13$
	% quantificado pelo modelo	$103,44 \pm 0,61$	$100,10 \pm 2,34$
Analista 2	Média teórica ($\mu\text{g/mL}$)	$39,9804 \pm 0,42$	$5,5528 \pm 0,04$
	Média quantificada pelo modelo ($\mu\text{g/mL}$)	$40,3082 \pm 0,40$	$5,6361 \pm 0,04$
	% quantificado pelo modelo	$100,82 \pm 0,96$	$101,50 \pm 0,67$
Entre analistas	Média teórica ($\mu\text{g/mL}$)	$40,0696 \pm 0,31$	$5,5736 \pm 0,07$
	Média quantificada pelo modelo ($\mu\text{g/mL}$)	$40,9242 \pm 0,87$	$5,6180 \pm 0,03$
	% quantificado pelo modelo	$102,13 \pm 1,85$	$100,80 \pm 0,99$
	Coeficiente de variação (%)	1,81	0,98

Os dados apresentados na TABELA 27, mais uma vez demonstraram que os modelos multivariados se apresentaram precisos na avaliação da precisão intermediária, uma vez que novamente os dois fármacos apresentaram valores de coeficiente de variação inferiores a 5%, conforme o exigido pela legislação.

c) Exatidão

Para a exatidão, as instituições reguladoras não determinam um valor apropriado, no caso das análises espectroscópicas. Sabendo-se que a exatidão deva ser o mais restrita possível e assumindo que para alguns casos, como as análises cromatográficas, os valores devem variar de $\pm 2\%$ no caso do losartano potássico e de $\pm 3\%$ para o besilato de anlodipino, conforme seu percentual de massa frente à massa do medicamento como um todo, fez-se uma avaliação do que seria considerado nesta análise, pesando as dificuldades encontradas durante o trabalho, que dizem respeito à diferença de concentração entre os fármacos e também à grande percentagem de excipientes presentes no medicamento, além do fato de o método espectroscópico na região do ultravioleta apresentar uma menor seletividade, quando comparados a métodos como a cromatografia e espectrometria de massas, por exemplo.

A exatidão foi avaliada através da adição de padrão, uma vez que não possuíamos todos os componentes do excipiente para manipularmos uma amostra fortificada, além de não conhecermos a exata composição dos excipientes.

Os valores de exatidão foram então considerados para a quantificação das amostras externas submetidas aos modelos multivariados, conforme expresso na TABELA 28.

Avaliando os resultados da TABELA 28, pôde-se considerar que os modelos multivariados desenvolvidos são considerados exatos, por apresentarem uma pequena variação na previsão de quantificação, ficando dentro do estabelecido pelas instituições reguladoras.

TABELA 28 - Resultados dos valores médios de previsão, com respectivo desvio padrão relativo, da quantificação pelos modelos multivariados PLS1 para a avaliação da exatidão

		Losartano potássico	Besilato de anlodipino
<i>Solução amostra F1</i> - concentração nominal	Média teórica (µg/mL)	40,1604 ± 0,21	5,5941 ± 0,04
	Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	40,0199 ± 0,18	5,5711 ± 0,03
	% quantificado pelo modelo	99,65 ± 0,46	99,59 ± 0,51
<i>Solução amostra F1</i> + 10% de padrões	Média teórica (µg/mL)	44,1761 ± 0,43	6,1538 ± 0,17
	Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	44,8468 ± 0,37	6,2193 ± 0,11
	% quantificado pelo modelo	111,67 ± 0,93	111,17 ± 2,00
<i>Solução amostra F1</i> + 20% de padrões	Média teórica (µg/mL)	48,1909 ± 0,89	6,7133 ± 0,05
	Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	48,7411 ± 0,93	6,8095 ± 0,04
	% quantificado pelo modelo	121,37 ± 2,32	121,72 ± 0,64

d) Robustez relacionada ao pH

Para o teste de robustez por variação do pH, três *soluções amostra D* foram preparadas, utilizando como solvente de dissolução dos fármacos na forma farmacêutica triturada o sistema acetonitrila:tampão fosfato 50:50 v/v, sendo neste teste utilizadas soluções de tampão fosfato com pH 2,8, pH 3,0 e pH 3,2.

Essa variação, de 0,2 unidades de pH foi pensada, uma vez que a variação de ± 0,5 unidades de pH, utilizada nos outros modelos testados, apresentou grande variação de resultados.

Após o preparo das *soluções de validação D* (em triplicata de cada uma), essas foram lidas em espectrofotômetro e os dados de absorvância foram submetidos aos modelos multivariados PLS1. Os espectros obtidos são demonstrados na FIGURA 31.

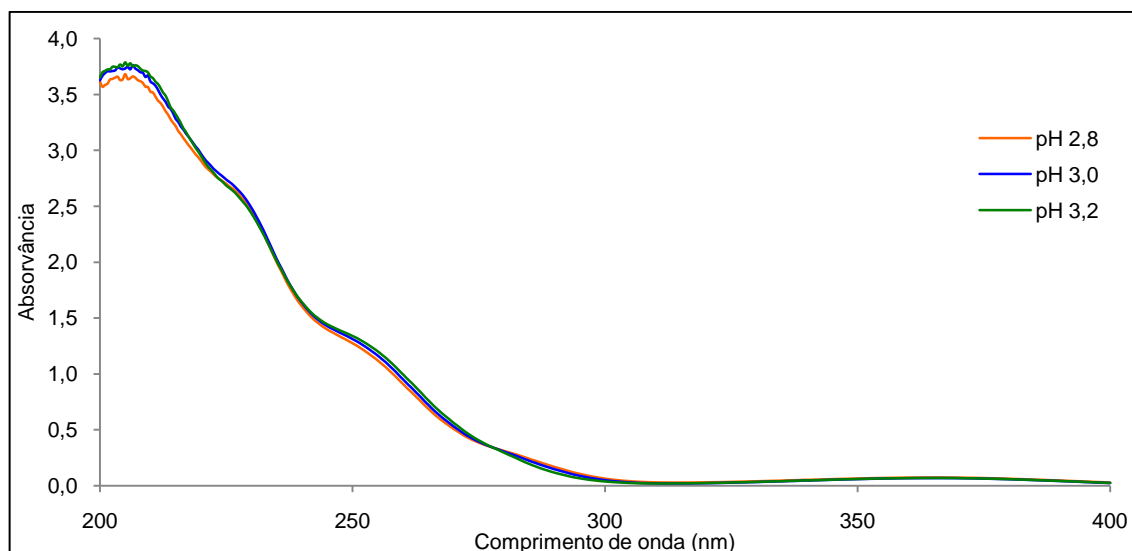


FIGURA 31 - Espectros na região do ultravioleta das *soluções de validação D* do medicamento comercial, na apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, solubilizadas em acetonitrila:tampão fosfato 50:50 (v/v), demonstrando alteração no pH do tampão fosfato, sendo pH 2,8, pH 3,0 (mesma condição do modelo) e pH 3,2.

É possível visualizar nos espectros da FIGURA 31, uma pequena variação nas absorvâncias da *solução de validação D* em que foi empregada como diluente, a solução tampão fosfato com pH 2,8, o que nos dá forte indício de que a variação na capacidade preditiva do modelo será mais afetada para esse sistema de solventes. Também pode-se dizer que o fármaco que terá sua quantificação mais afetada pela variação do pH (diminuição) será o losartano potássico, uma vez que a variação espectral observada se encontra na região do espectro utilizada para a montagem do modelo PLS1 de quantificação deste fármaco.

Analisando os dados expostos na TABELA 29, verificamos que, apesar dos valores de coeficiente de variação se apresentarem inferiores a 5%, na quantificação da amostra solubilizada com tampão fosfato pH 2,8 há uma diferença significativa ($p < 0,05$) na capacidade preditiva do modelo, causada pela pequena variação no seu perfil espectroscópico.

Dessa forma, concluiu-se que o modelo multivariado PLS1 desenvolvido para o losartano potássico não é robusto frente a essa pequena variação no pH do tampão fosfato da solução diluente. E apesar de o besilato de anlodipino não sofrendo alterações frente ao pH, como os dois fármacos são analisados conjuntamente, essa variação deve ser cuidadosamente verificada durante a fase de preparo das *soluções amostra*.

TABELA 29 - Resultados dos valores médios de previsão, com respectivo desvio padrão relativo, da quantificação pelos modelos multivariados PLS1 para a avaliação das análises de robustez relacionada ao pH da solução tampão

		Losartano potássico	Besilato de anlodipino			Losartano potássico	Besilato de anlodipino
pH 2,8	Média teórica ($\mu\text{g/mL}$)	40,1614 \pm 0,01	5,5943 \pm 0,17	pH 3,2	Média teórica ($\mu\text{g/mL}$)	40,1612 \pm 0,02	5,5942 \pm 0,02
	Média quantificada pelo modelo ($\mu\text{g/mL}$)	39,9204 \pm 0,08	5,5999 \pm 0,13		Média quantificada pelo modelo ($\mu\text{g/mL}$)	40,9805 \pm 0,07	5,5763 \pm 0,03
	% quantificado pelo modelo	99,40 \pm 0,20	100,10 \pm 2,34		% quantificado pelo modelo	102,04 \pm 0,16	99,68 \pm 0,54
pH 3,0	Média teórica ($\mu\text{g/mL}$)	40,1587 \pm 0,20	5,5943 \pm 0,09	pH 3,0	Média teórica ($\mu\text{g/mL}$)	40,1587 \pm 0,20	5,5943 \pm 0,09
	Média quantificada pelo modelo ($\mu\text{g/mL}$)	41,5402 \pm 0,25	5,5339 \pm 0,04		Média quantificada pelo modelo ($\mu\text{g/mL}$)	41,5402 \pm 0,25	5,5339 \pm 0,04
	% quantificado pelo modelo	103,44 \pm 0,61	98,92 \pm 0,70		% quantificado pelo modelo	103,44 \pm 0,61	98,92 \pm 0,70
Comparativo	Média teórica ($\mu\text{g/mL}$)	40,1600 \pm 0,13	5,5943 \pm 0,12	Comparativo	Média teórica ($\mu\text{g/mL}$)	40,1599 \pm 0,13	5,5943 \pm 0,06
	Média quantificada pelo modelo ($\mu\text{g/mL}$)	40,7303 \pm 1,15	5,5669 \pm 0,05		Média quantificada pelo modelo ($\mu\text{g/mL}$)	41,2603 \pm 0,40	5,5551 \pm 0,03
	% quantificado pelo modelo	101,42 \pm 2,85	99,51 \pm 0,84		% quantificado pelo modelo	102,74 \pm 0,99	99,30 \pm 0,54
	Coefficiente de variação (%)	2,81	0,84		Coefficiente de variação (%)	0,96	0,54
	Teste T (p)	0,009278	0,42265		Teste T (p)	0,083032	0,222727

e) Robustez relacionada à temperatura de leitura

A variação da temperatura de leitura englobou uma variação da temperatura ambiente para mais e para menos, conforme o exposto na TABELA 30. As *soluções de validação D* foram preparadas em triplicata, mantendo-se a temperatura de leitura em cubas com água resfriada ou aquecida, conforme a necessidade. Durante a análise espectroscópica, as soluções foram mantidas nas temperaturas de $18 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura ambiente e $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

TABELA 30 - Resultados dos valores médios de previsão, com respectivo desvio padrão, da quantificação pelos modelos multivariados PLS1 para a avaliação das análises de robustez relacionada à temperatura de leitura

		Losartano potássico	Besilato de anlodipino			Losartano potássico	Besilato de anlodipino
18±2°C	Média teórica (µg/mL)	40,3348 ± 0,22	5,5944 ± 0,06	35±2°C	Média teórica (µg/mL)	40,1604 ± 0,20	5,5940 ± 0,01
	Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	41,7223 ± 0,23	5,5088 ± 0,05		Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	41,3532 ± 0,16	5,5576 ± 0,05
	% quantificado pelo modelo	103,44 ± 0,57	98,47 ± 0,88		% quantificado pelo modelo	102,97 ± 0,39	99,35 ± 0,96
Ambiente	Média teórica (µg/mL)	39,9848 ± 0,19	5,5940 ± 0,03	Ambiente	Média teórica (µg/mL)	39,9848 ± 0,19	5,5940 ± 0,03
	Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	41,5402 ± 0,25	5,5274 ± 0,05		Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	41,5402 ± 0,25	5,5274 ± 0,05
	% quantificado pelo modelo	103,89 ± 0,61	98,81 ± 0,95		% quantificado pelo modelo	103,89 ± 0,61	98,81 ± 0,95
Comparativo	Média teórica (µg/mL)	40,1614 ± 0,26	5,5576 ± 0,04	Comparativo	Média teórica (µg/mL)	39,8920 ± 0,20	5,5846 ± 0,02
	Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	41,6313 ± 0,13	5,5181 ± 0,01		Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	41,2603 ± 0,40	5,5332 ± 0,03
	% quantificado pelo modelo	103,66 ± 0,31	99,29 ± 1,15		% quantificado pelo modelo	103,43 ± 0,65	99,08 ± 0,38
	Coefficiente de variação (%)	0,31	0,24		Coefficiente de variação (%)	0,63	0,62
	Teste T (p)	0,405245	0,204833		Teste T (p)	0,47769	0,276874

Conforme os resultados obtidos, a variação da temperatura não se mostrou capaz de afetar a capacidade preditiva dos modelos multivariados PLS1, afirmação esta comprovada pelos valores de coeficiente de variação inferiores a 5% e também pelos valores de p (teste T), onde para todos os modelos, os valores de p se apresentaram >0,05, não sendo, portanto, estatisticamente diferentes.

f) Robustez relacionada à estabilidade dos fármacos na solução de leitura

Duas avaliações diferentes foram realizadas para esse parâmetro.

A *solução de validação D* foi avaliada somente nas primeiras 12 horas após o preparo (estabilidade de bancada), pois essa solução sofre precipitação visível,

após 24 horas. Como a espectroscopia na região do ultravioleta é uma metodologia sensível à turvação, essa precipitação impossibilitaria a quantificação dos fármacos.

Uma segunda avaliação foi realizada em misturas das soluções dos dois padrões, chamadas aqui de *solução padrão diluída*, que foi preparada com a solução diluente acetonitrila:tampão fosfato pH 3,0, sendo sua estabilidade avaliada frente à refrigeração, durante um período de até sete dias.

Todas as amostras foram analisadas em sextuplicata contendo a mesma diluição utilizada para o preparo da *solução de validação D*.

Os dados de quantificação foram tratados estatisticamente obtendo-se tanto os dados de coeficiente de variação, como os dados do teste T. Entretanto, como não houve grande variação entre as leituras no espectrofotômetro, o que é um fator importante para a diversidade de populações estatísticas, os dados do teste T se apresentaram inconsistentes, não condizendo com os valores de quantificação obtidos pelos modelos. Dessa forma, os valores considerados foram os do coeficiente de variação, expostos abaixo.

Sobre a estabilidade de bancada da *solução de validação D*, a mesma foi realizada durante um dia de trabalho, ficando as *soluções de validação D* preparadas, expostas à temperatura e à luz ambiente. Os dados expostos na TABELA 31 demonstram que a solução apresentou estabilidade após seu preparo, nas primeiras 12 horas. Observa-se também que há uma degradação gradual de ambos os fármacos, porém mais pronunciada no besilato de anlodipino. Os valores de coeficiente de variação, abaixo de 5%, comprovaram a estabilidade da *solução de validação D* no período avaliado.

Para a análise de estabilidade da solução contendo a *solução padrão diluída*, foram preparadas *soluções estoque* de cada um dos fármacos em separado, com concentração final de 1,0 mg/mL, para ambos.

TABELA 31 - Resultados dos valores médios de previsão, com respectivo desvio padrão relativo, da quantificação pelos modelos multivariados PLS1 para a avaliação das análises de robustez relacionada à estabilidade da solução de validação D

Tempo de exposição da solução preparada na bancada	Média teórica (µg/mL)	Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	% quantificado pelo modelo	Coefficiente de variação (%)
Losartano potássico				
4 horas	40,1604 ± 0,01	40,3130 ± 0,01	100,38 ± 0,03	0,03
8 horas	40,1604 ± 0,01	40,3047 ± 0,02	100,36 ± 0,06	0,06
12 horas	40,1604 ± 0,01	40,2964 ± 0,04	100,34 ± 0,09	0,09
Besilato de anlodipino				
4 horas	5,5941 ± 0,02	5,6176 ± 0,06	100,42 ± 1,12	1,12
8 horas	5,5941 ± 0,02	5,5804 ± 0,12	99,76 ± 2,06	2,07
12 horas	5,5941 ± 0,02	5,5432 ± 0,17	99,09 ± 3,01	3,03

As soluções foram analisadas de duas formas diferentes: logo após o preparo da *solução estoque*, a *solução padrão diluída* foi preparada e analisada por até 12 h. As *soluções estoque* também foram armazenadas em geladeira logo após o preparo, sendo avaliadas por até sete dias, conforme o exposto na TABELA 32 e na TABELA 33. Essa análise foi conduzida da seguinte forma: no momento da leitura, as soluções eram retiradas da refrigeração e deixadas até atingir temperatura ambiente. As *soluções padrão diluídas* provenientes das *soluções estoque* foram comparadas com soluções dos padrões recém-preparadas.

Partindo-se dos dados apresentados, concluiu-se que a solução exposta à temperatura e à iluminação ambientes sofre degradação mais rápida que a amostra refrigerada. Ainda sobre a análise de bancada, observou-se que com 10 horas de exposição, a solução já apresentou uma perda significativa da capacidade de previsão do modelo, apresentando valores de coeficiente de variação maiores que 5% com 12 horas de exposição.

No longo prazo, sob refrigeração, verificou-se que os analitos apresentaram estabilidade durante o período avaliado (uma semana) com valores de coeficiente de variação abaixo de 5%.

Por todos esses fatores, ficou estabelecido que a leitura das soluções amostra deve ser realizada o mais próximo possível da preparação dessas soluções, para evitar perda na capacidade preditiva do modelo.

TABELA 32 - Resultados dos valores médios de quantificação para o losartano potássico, com respectivo desvio padrão relativo, pelo modelo multivariado PLS1 para a avaliação da robustez relacionada à estabilidade da solução padrão diluída

Tempo de exposição da solução preparada na bancada	Tipo de armazenagem	Média teórica (µg/mL)	Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	% quantificado pelo modelo	Coefficiente de variação (%)
4 horas	Ambiente	40,0960	39,4758 ± 0,04	98,45 ± 0,10	0,10
8 horas	Ambiente	40,0960	39,3615 ± 0,21	98,17 ± 0,50	0,51
10 horas	Ambiente	40,0960	38,8140 ± 1,00	96,80 ± 2,43	2,51
12 horas	Ambiente	40,0960	37,5592 ± 2,75	93,67 ± 6,85	7,32
24 horas	Geladeira	40,0960	39,5279 ± 0,31	98,58 ± 0,78	0,79
48 horas	Geladeira	40,0960	39,5815 ± 0,42	98,72 ± 1,05	1,06
72 horas	Geladeira	40,0960	38,3823 ± 0,29	95,73 ± 0,72	0,75
7 dias	Geladeira	40,0960	38,6500 ± 0,23	96,39 ± 0,58	0,60

TABELA 33 - Resultados dos valores médios de quantificação para o besilato de anlodipino, com respectivo desvio padrão relativo, pelo modelo multivariado PLS1 para a avaliação da robustez relacionada à estabilidade da solução padrão diluída

Tempo de exposição da solução preparada na bancada	Tipo de armazenagem	Média teórica (µg/mL)	Média quantificada pelo modelo (µg/mL)	% quantificado pelo modelo	Coefficiente de variação (%)
4 horas	Ambiente	5,4780	5,4659 ± 0,01	99,78 ± 0,47	0,13
8 horas	Ambiente	5,4780	5,3721 ± 0,13	98,07 ± 2,24	2,34
10 horas	Ambiente	5,4780	5,3053 ± 0,22	96,83 ± 3,93	4,15
12 horas	Ambiente	5,4780	5,2239 ± 0,35	95,36 ± 6,15	6,75
24 horas	Geladeira	5,4780	5,9417 ± 0,06	108,46 ± 1,01	0,95
48 horas	Geladeira	5,4780	5,7598 ± 0,07	105,14 ± 1,32	1,28
72 horas	Geladeira	5,4780	5,6758 ± 0,08	103,61 ± 1,38	1,36
7 dias	Geladeira	5,4780	5,8164 ± 0,13	106,18 ± 2,36	2,27

5.4.2.2.2 Comparação entre os dados obtidos por diferentes metodologias para quantificação dos fármacos besilato de anlodipino e losartano potássico no medicamento comercial, apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico

Partindo do método validado de quantificação simultânea dos fármacos besilato de anlodipino e losartano potássico para a apresentação comercial 2,5 + 50 mg (PEDROSO, 2009), foi também realizado, para fins de comparação com o novo método desenvolvido, a quantificação dos fármacos na apresentação comercial 5 + 50 mg por cromatografia líquida de alta eficiência, e simultaneamente, pela espectroscopia na região do ultravioleta com calibração multivariada. Os resultados obtidos estão mostrados na TABELA 34. Comparando os dados obtidos pelos diferentes métodos, a espectroscopia na região do ultravioleta com calibração multivariada mostrou-se capaz de ser utilizada para quantificação destes fármacos na forma farmacêutica, como uma alternativa à cromatografia líquida, com menor custo e menor geração de resíduos.

TABELA 34 - Dados percentuais comparativos, com respectivo desvio padrão relativo, do medicamento comercial, na apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, demonstrando sua equivalente capacidade preditiva

	Cromatografia líquida de alta eficiência	Espectroscopia na região do ultravioleta com calibração multivariada
Losartano potássico	101,95 ± 0,72	99,65 ± 0,46
Besialto de anlodipino	100,42 ± 0,73	99,59 ± 0,51

6 CONCLUSÕES

A proposta de desenvolver uma metodologia de quantificação dos fármacos no medicamento comercial, na apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, que gerasse menos resíduos ao ambiente, utilizando a espectroscopia na região do infravermelho com reflectância difusa, não levou, até o momento, a resultados satisfatórios. A grande quantidade de excipientes presente na forma farmacêutica dificultou o desenvolvimento do modelo de calibração multivariada utilizando esta metodologia. No entanto, novos estudos devem ser realizados, buscando atenuar os sinais interferentes, se possível, e utilizando as outras apresentações do medicamento comercial (5 + 50 mg e 5 + 100 mg), com maior teor dos princípios ativos.

Neste trabalho foram desenvolvidos modelos de calibração multivariada utilizando a espectrofotometria na região do ultravioleta para duas apresentações do medicamento comercial, nas apresentações 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico e 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico.

Os modelos do tipo PLS2, onde a quantificação seria simultânea, não apresentou resultados satisfatórios para nenhuma das apresentações estudadas.

Os modelos multivariados do tipo PLS1 desenvolvidos para a quantificação dos fármacos no medicamento comercial, apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, utilizando faixa espectral distinta para cada fármaco (230 nm a 310 nm para o losartano potássico e 320 nm a 400 nm para o besilato de anlodipino), se mostraram adequados frente à validação externa. No entanto, não foram obtidos resultados satisfatórios na validação para estes modelos.

No desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada do tipo PLS1 para a quantificação dos fármacos no medicamento comercial, na apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, as mesmas faixas espectrais foram utilizadas, obtendo validação externa adequada, além de ter esses modelos validados, atendendo aos critérios de precisão, exatidão e robustez. O único ponto a ser observado com cuidado nesse caso, foi a robustez frente à alteração do pH da solução tampão utilizada como solução diluente para o preparo das soluções amostra, que deve ser cuidadosamente verificado, para evitar perda de capacidade preditiva dos modelos.

Em virtude dos bons resultados obtidos pelos modelos multivariados do tipo PLS1 desenvolvidos para a quantificação dos fármacos no medicamento comercial, na apresentação 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, o próximo passo seria desenvolver modelos de calibração multivariada para o medicamento comercial, na apresentação 2,5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico, adicionando ao conteúdo triturado das cápsulas quantidade de padrão de anlodipino suficiente para atingir a concentração de 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico. Estes estudos se encontram em andamento.

O método por espectroscopia na região do ultravioleta com calibração multivariada desenvolvido mostrou-se eficaz na quantificação dos fármacos anlodipino e losartano potássico (apresentação comercial 5 mg de anlodipino + 50 mg de losartano potássico), quando comparado com o método por cromatografia líquida de alta eficiência, apresentando menor custo e menor geração de resíduos.

7 REFERÊNCIAS

ALCALÀ, M. *et al.* On-line monitoring of a granulation process by NIR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 1, p.336-345, 2009.

ANSARI, M. *et al.* A comparative study of first-derivative spectrophotometry and high-performance liquid chromatography applied to the determination of losartan potassium in tablets. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 10, p.1166-1170, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025:2005 - Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

BALESTEROS, M. R.; FARIA, A. F.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Determination of losartan associated with chlorthalidone or hydrochlorothiazide in capsules by capillary zone electrophoresis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 3, p.554-558, 2007.

BASAVAIAH, K.; CHANDRASHEKAR, U.; NAGEGOWDA, P. Titrimetric and modified spectrophotometric methods for the determination of amlodipine besylate using bromate-bromide mixture and two dyes. **Science Asia**, v. 32, n. 3, p.271-278, 2006.

BONFILIO, R. *et al.* Losartan potassium dissolution test for drug release evaluation in pharmaceutical capsules using HPLC and UV spectrophotometry. **Química Nova**, v. 33, n., p.377-383, 2009a.

BONFILIO, R. *et al.* Multivariate optimization and validation of an analytical methodology by RP-HPLC for the determination of losartan potassium in capsules. **Talanta**, v. 80, n. 1, p.236-241, 2009b.

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Figures of merit for the determination of the polymorphic purity of carbamazepine by infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 8, p.2124-2134, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde, ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em:<<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=56&data=02/06/2003>>. Acesso em:15/05/2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de gestão clínica de hipertensão arterial e diabetes mellitus da atenção básica - SISHIPERDIA**. 2009. Disponível em: <http://hiperdia.datasus.gov.br/>. Acesso em: 12/05/2010.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, v. 125, n. 11, p.2125-2154, 2000.

BRITISH Pharmacopoeia 2007. 5. London: The Stationnery Office on behalf of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, 2007.

BRO, R. Multivariate calibration: what is in chemometrics for the analytical chemist? **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1-2, p.185-194, 2003.

BROWN, M. J. *et al.* Better blood pressure control: how to combine drugs. **J Hum Hypertens**, v. 17, n. 2, p.81-86, 2003.

BRUNTON, L. L.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman's – manual of pharmacology and therapeutics**. BLUMENTHAL, D. K. B., I. L. O., 2008. Acesso em: 2010/03/10.

CHOBANIAN, A. V. *et al.* Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p.1206-1252, 2003.

CORDEIRO, G. A. **Desenvolvimento de modelos multivariados para quantificação de fármacos utilizando-se técnicas espectroscópicas**. 121 f. - Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

CORRER, C. J. **Uso da calibração multivariada na determinação de ácido kójico em formas farmacêuticas de uso tópico**. f. Dissertação - Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

DHABALE, P. N.; BHAGADE, S. R. Simultaneous UV spectrophotometric methods for estimation of amlodipine besilate and olmesartan medoxomil in tablet dosage form. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p.650-656, 2011.

DINÇ, E.; ÖZDEMİR, A. Linear regression analysis and its application to multivariate chromatographic calibration for the quantitative analysis of two-component mixtures. **II Farmaco**, v. 60, n. 6-7, p.591-597, 2005.

DINÇ, E.; ÜSTÜNDAĞ, Ö. Application of multivariate calibration techniques to HPLC data for quantitative analysis of a binary mixture of hydrochlorothiazide and losartan in tablets. **Chromatographia**, v. 61, n. 5, p.237-244, 2005.

DURGA RAO, D. *et al.* Simultaneous determination of losartan potassium, atenolol and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations by stability-indicating UPLC. **Chromatographia**, v. 70, n. 3-4, p.647-651, 2009.

ESCANDAR, G. M. *et al.* A review of multivariate calibration methods applied to biomedical analysis. **Microchemical Journal**, v. 82, n. 1, p.29-42, 2006.

ESCOBAR, C.; BARRIOS, V. Combined therapy in the treatment of hypertension. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 1, p.3-8, 2009.

FERREIRA, M. H.; GOMES, J. F. F.; SENA, M. M. Development and validation of a multivariate calibration model for determination of dipyrone in oral solutions by near infrared spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, p.1680-1686, 2009.

FERREIRA, M. M. C. *et al.* Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n., p.724-731, 1999.

FEUDALE, R. N. *et al.* Transfer of multivariate calibration models: a review. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 64, n. 2, p.181-192, 2002.

GOODARZI, M. *et al.* Direct orthogonal signal correction-partial least squares for simultaneous spectrophotometric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceutical formulation and synthetic samples. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 54, n., p.309-313, 2009.

GRADMAN, A. H. *et al.* Combination therapy in hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 4, n. 2, p.90-98, 2010.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2001.

HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1-2, p.365-377, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 2010. Acesso em: 13/01/2011.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH. **ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**, 2005.

JANKOVICS, P. *et al.* Amlodipine besilate screening in pharmaceutical preparations by CE. **Chromatographia**, v. 68, n. SUPPL. 1, p.S43-S48, 2008.

JOSHI, S.; KARBHARI, P.; BHOIR, S. RP-LC simultaneous determination of nebivolol hydrochloride and amlodipine besilate in bi-layer tablets. **Chromatographia**, v. 70, n. 3, p.557-561, 2009.

KAVITHA, J.; MURALIDHARAN, S. Development and validation of new method for atenolol, hydrochlorothiazide and losartan potassium by RP-HPLC: its application to routine quality control analysis. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, n. 2, 2010.

KOHLMANN JR, O. *et al.* Estudo "LOTHAR": avaliação de eficácia e tolerabilidade da combinação fixa de anlodipino e losartana no tratamento da hipertensão arterial primária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 86, n., p.39-51, 2006.

LABCOMPLIANCE. **Validation of Analytical Methods and Procedures**. 2010. Disponível em: http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/#08_paramters. Acesso em: 04/03/2011.

LASTRA, O. C. *et al.* Development and validation of an UV derivative spectrophotometric determination of losartan potassium in tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 2, p.175-180, 2003.

LATHEESHJLAL, L. *et al.* Spectrophotometric determination of lorsartan potassium and its dosage form by bromothymol blue and phosphate buffer. **E-Journal of Chemistry**, v. 7, n. 1, p.320-324, 2010.

LAW, M. R. *et al.* Value of low dose combination treatment with blood pressure lowering drugs: analysis of 354 randomised trials. **BMJ**, v. 326, n. 7404, p.1427-, 2003.

LINDHOLM, L. H. *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. **The Lancet**, v. 359, n. 9311, p.1004-1010, 2002.

LORBER, A.; FABER, K.; KOWALSKI, B. R. Net Analyte Signal Calculation in Multivariate Calibration. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 8, p.1620-1626, 1997.

MAGGIO, R.; CASTELLANO, P.; KAUFMAN, T. A multivariate approach for the simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide in a combined pharmaceutical tablet formulation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 8, p.2949-2955, 2008.

MANCIA, G. *et al.* 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension. **European Heart Journal**, v. 28, n. 12, p.1462-1536, 2007.

MERCK. **The Merck Index**. 13. ed. New Jersey: Merck & Company Incorporated, 2001.

NAGAVALLI, D. *et al.* Simultaneous spectrophotometric determination of losartan potassium, amlodipine besilate and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals by chemometric methods. **Acta Pharmaceutica**, v. 60, n. 2, p.141-152, 2010.

NIEMEIJER, M.; CLEOPHAS, T. Combination therapy with olmesartan and amlodipine in the treatment of hypertension. **Pharmaceuticals**, v. 2, n. 3, p.125-133, 2009.

PANCHAL, H.; SUHAGIA, B. Simultaneous analysis of atorvastatin calcium and losartan potassium in tablet dosage forms by RP-HPLC and HPTLC. **Acta Chromatographica**, v. 22, n. 2, p.173-187, 2010.

PAREEK, A. *et al.* Efficacy and tolerability of a fixed-dose combination of metoprolol extended release/amlodipine in patients with mild-to-moderate hypertension: a randomized, parallel-group, multicentre comparison with losartan plus amlodipine. **Clinical Drug Investigation**, v. 30, n. 2, p.123-131 10.2165/11531770-000000000-00000, 2010.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p.198-219, 2003.

PATIL, P. R. *et al.* RP-HPLC method for simultaneous estimation of losartan potassium and amlodipine besylate in tablet formulation. **International Journal of Chem Tech Research**, v. 1, n. 3, p.464-469, 2009a.

PATIL, P. R. *et al.* Simultaneous UV spectrophotometric method for estimation of losartan potassium and amlodipine besylate in tablet dosage form. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v. 2, n. 2, p.183-187, 2009b.

PEDROSO, C. *et al.* A validated RP–LC method for simultaneous determination of losartan potassium and amlodipine besilate in pharmaceutical preparations. **Chromatographia**, v. 69, n. 2, p.201-206, 2009.

PEDROSO, C. F. **Desenvolvimento e validação de um método por CLAE, para determinação simultânea de losartano e anlodipino em associações utilizadas no tratamento da hipertensão arterial**. 86 f. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L. D.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 10, n., p.106-110, 2005.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. D. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p.268-277, 1996.

PORTUGAL. **Farmacopeia Portuguesa**. 7. ed. Lisboa: Ministério da Saúde, 2002.

PRABHAKAR, A. H.; GIRIDHAR, R. A rapid colorimetric method for the determination of losartan potassium in bulk and in synthetic mixture for solid dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, n. 6, p.861-866, 2002.

RAHMAN, N.; SIDDIQUI, M. R.; AZMI, S. N. H. Development and validation of kinetic spectrophotometric method for the determination of losartan potassium in pure and commercial tablets. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 53, n. 3, p.735-743, 2006.

RAKESH, S. U. *et al.* New UV spectrophotometric methods applied to the simultaneous estimation of losartan potassium and amlodipine besylate in tablet dosage form. **Indian Drugs**, v. 47, n. 3, p.39-43, 2010.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n., p.771-780, 2004.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Strategies to increase sensitivity in UV-VIS spectrophotometry. **Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS**, v. 27, n. 5, p.807-812, 2004.

ROHATAGI, S. *et al.* Pharmacokinetics of amlodipine and olmesartan after administration of amlodipine besylate and olmesartan medoxomil in separate dosage forms and as a fixed-dose combination. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, n. 11, p.1309-1322, 2008.

SENA, M. M. *et al.* Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 4, p.743-749, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Spectrometric identification of organic compounds**. 6. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1997.

SINGHVI, I.; BHATIA, M. S. Colorimetric methods for estimation of losartan potassium from tablet formulation. **Asian Journal of Chemistry**, v. 18, n. 2, p.1537-1539, 2006.

SKOOG, D. A. *et al.* **Analytical chemistry – an introduction**. 7. ed. Orlando: Harcourt Inc., 2000.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes brasileiras de hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 1 supl.1, p.1-51, 2010.

SOLOMONS, T. W. G. **Química orgânica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1996.

TAMAKI, T. *et al.* EXP3174: the major active metabolite of losartan. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 15, n. 2, p.122-136, 1997.

TARLEY, C. R. T. *et al.* Chemometric tools in electroanalytical chemistry: methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, n. 1, p.58-67, 2009.

THOMAS, A. B. *et al.* Simultaneous estimation of losartan potassium and atenolol in tablet dosage form. **Indian Drugs**, v. 44, n. 10, p.745-750, 2007.

THE UNITED States Pharmacopeia. 29. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2006.

VALDERRAMA, P. **Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo**. 128 f. Dissertação - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n., p.1278-1287, 2009.

VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, n. 8-10, p.867-869, 1996.

WANKHEDE, S. B. *et al.* Spectrophotometric and HPLC methods for simultaneous estimation of amlodipine besilate, losartan potassium and hydrochlorothiazide in tablets. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 1, p.136-140, 2010.